Zum Wirkungsmechanismus des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin

Franz Matschinsky

1959

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DES KNOLLENBLÄTTERPILZGIFTES PHALLOIDIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Franz Matschinsky
aus
Breckerfeld

München 1959

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O Wieland

1. Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

2. Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt

3. Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. W. Forst

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 7. 1959

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

"UNI"-Druck, München 13, Amalienstraße 85

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Zur Methodik:	
Fermentuntersuchungen	3
Substratmessungen	18
Serumelektrophorese	19
Versuchstiere	20
Ergebnisse:	
Einfluß der Phalloidinvergiftung auf verschiedene Leberenzyme	21
Diskussion	26
Veränderung der Proteinverteilung im Blutserum von Mäusen unter Einfluß von Phalloidin	29
Diskussion	31
Einfluß des Alloxandiabetes von Ratten auf die Phalloidinvergiftung	32
Diskussion	36
Glukoseproduktion und Farbstoffelimination durch die isolierte Meerschweinchenleber bei Phalloidinvergiftung	38
Diskussion	44
Zusammenfassung	47
Literaturverzeichnis	49
Lebenslauf und Anhang	55

Meinen Eltern und Geschwistern

in Dankbarkeit gewidmet

EINLEITUNG

Die Wirkungsweise der verschiedenen Giftkomponenten des Knollenblätterpilzes, des Phalloidins (M. Vogt) (69) und des α-Amanitins (O. Wieland, H.E. Fischer und M. Reiter) (77) ist von zwei Seiten mit dem übereinstimmenden Ergebnis untersucht worden, daß der Vergiftungsablauf in beiden Fällen durch eine deutliche Latenzzeit, eine nachfolgende Adynamie und einen terminalen Blutzuckerabfall charakterisiert ist, mit dem einzigen Unterschied, daß der Tod nach Phalloidin viel rascher eintritt als nach Amanitin. Als weiteres Zeichen einer tiefgreifenden Beeinträchtigung des Kohlenhydratstoffwechsels fanden O. Wieland, H.E. Fischer und M. Reiter (77) bei der Amanitinvergiftung einen völligen Glykogenverlust der Mäuseleber schon nach wenigen Stunden, eine Unfähigkeit des Organs, parenteral zugeführte Glukose zu verwerten, und als letzte Erscheinung eine renalbedingte Glukosurie. Die Untersuchungen des Serumproteinspektrums bei Mäusen, Ratten und Fröschen durch Th. Wieland und K. Dose (79) führten zu der Annahme, daß der sicher beobachtete Rückgang in der Albuminfraktion auf eine Unterbindung der Proteinsynthese in der Leber zurückzuführen sei. Isoliert standen bisher die Befunde der Franzosen J. Verne, P.F. Ceccaldi und S. Hebert (12) zu dieser Problemstellung, die auf Grund histologischer Untersuchungen des Pankreas die Erscheinungen nach der Pilzvergiftung dem Ausfall der α-Zellen des Inselorgans zuschreiben; durch Zerstörung der β-Zellen mit Hilfe von Alloxan glaubten sie eine Wiederherstellung des hormonellen Gleichgewichts erzielen und damit die größere Resistenz diabetischer Tiere gegen das Gift erklären zu können.

Auf der Suche nach einer Deutung der angeführten Befunde wird in der vorliegenden Arbeit zunächst nach Erscheinungen gefahndet, die eine Dimension tiefer an den Enzymsystemen unter Phalloidinwirkung auftreten und zu einer größeren Einsicht in den Wirkungsmechanismus des Giftes führen könnten. Folgende Leberenzyme wurden auf ihr Verhalten geprüft: Citrat-Condensingenzym (CDE), ATP-Hexose-Transphosphatase (ATP-HTP), β-Ketothiolase (β-KTH), Milchsäuredehydrogenase (MDH), β-Hydroxyacyldehydrogenase (β-HAD), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PD). Da eine enge Beziehung zwischen dem Verhalten des Zelleiweißes und der Plas-

maproteine besteht, konnte man aus der Beobachtung des Serumproteinspektrums vergifteter Tiere einen weiteren Anhaltspunkt zur Lösung des Problems erwarten. Es wurde außerdem versucht, die oben erwähnte günstige Beeinflußung des Vergiftungsablaufes durch den Alloxandiabetes näher zu analysieren und für das Verständnis der Giftwirkung nutzbar zu machen. Bei Durchströmungsversuchen endlich kam es darauf an, ob die beim Ganztier auftretende initiale Hyperglykämie (vergl. die früheren Beobachtungen) (77) auch an der isolierten Leber festzustellen war, d.h. ob ein Angriffspunkt des Giftes im Sinne der Adrenalin- oder Glukagonwirkung anzunehmen sei.

Das bei den Untersuchungen verwendete kristallisierte Phalloidin verdanken wir Herrn Prof. Th. Wieland.

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AAC = N-Acetyl-S-Acetacetyl-Cysteamin
AAP = Acetacetyl-Pantethein
(letztere beiden Modellsubstanzen wurden anstelle der natürlichen CoA-derivate für die Teste als Substrat eingesetzt (38; 46))
ADP = Adenosindiphosphorsäure
ADH = Alkoholdehydrogenase
ÄDH = Äpfelsäuredehydrogenase
ATP = Adenosintriphosphorsäure
ATP-HTP = ATP-Hexosetransphophatase (Hexokinase)
BTS = Brenztraubensäure
CDE = Citrat-Condensing-Enzym
DPN = Diphosphopyridinnukleotid
G-6-PD = Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
β-HAD = β-Hydroxyacyldehydrogenase
α-KGS = α-Ketoglutarsäure
β-KTH = β-Ketothiolase
MDH = Milchsäuredehydrogenase
TPN = Triphosphopyridinnukleotid
TRAM = Triäthanolamin
TRIS = Trishydroxymethylaminomethan

ZUR METHODIK

Fermentuntersuchungen

Die in dieser Arbeit angewandten Untersuchungsverfahren zur Messung von Fermentaktivitäten folgen dem Prinzip des einfachen und zusammengesetzten optischen Testes von O. Warburg (72), beruhend auf photometrisch erfaßbaren, der katalytischen Aktivität eines Enzyms proportionalen Konzentrationsänderungen von Substraten oder Produkten einer biochemischen Reaktion.

Auf der Extinktionszu- bzw. -abnahme entsprechend der Bildung oder dem Verbrauch von TPNH bzw. DPNH, gemessen bei einer Wellenlänge von λ = 366 mμ im Photometer Eppendorf, fußen die Aktivitätsmessungen von ATP-HTP, CDE, G-6-PD, GOT, β-HAD und MDH. Das Substrat der β-KTH, das Magnesiumenolat des AAP, absorbiert bei λ = 313 mμ(46), bei 405 mμ das p-Nitroanilin als Substrat der Arylaminacetylase, die zur Bestimmung von Acetyl-CoA herangezogen wurde (67).

Bei allen angewendeten Testen gilt als Aktivitätseinheit eine Extinktionsänderung von 0,001 pro Minute bei der entsprechenden Wellenlänge und Temperatur. Die spezifische Aktivität wird ausgedrückt in Enzymeinheiten pro mg Protein.

Im folgenden sollen die Aktivitätsteste der verschiedenen von uns untersuchten Enzyme in ihrer Anwendung auf Organextrakte kurz beschrieben und ihre Kinetik graphisch dargestellt werden.

Glukose-6-phosphatdehydrogenase (oder Zwischenferment bzw. nach einer neueren Nomenklatur (32) Glukose-6-Phosphat-TPN-Transhydrogenase).

Die G-6-PD, 1931 von O. Warburg und W. Christian in Pferdebluterythrozyten entdeckt (73), katalysiert folgende irreversible Gesamtreaktion:

$$\text{Glukose-6-Phosphat} + H_2O + TPN^+ \rightarrow \text{6-Phosphoglukonsäure} + TPNH + H^+ \quad (1)$$

Die Extinktionszunahme bei 366 mμ, entsprechend einer Zunahme von TPNH, dient der Aktivitätsmessung des Fermentes.

Reagenzien: 0,2 M Triäthanolamin (TRAM) -Puffer, pH 7,3 (22)
TPN, enthaltend 5 mg pro ml. (Es stand 95 - 100 %-iges TPN von der Sigma Chemical Company zur Verfügung).
0,087 M Glukose-6-Phosphorsäure wurde aus dem Calciumsalz (G-6-Ph-Ca der Fa. Boehringer, Nr. 15150) gewonnen durch stöchiometrische Ausfällung des Calciums mit Oxalsäure, Abzentrifugieren des Calciumoxalatpräzipitats und nachheriger Neutralisation des Überstehenden mit 2n Kalilauge.

Ausführung des Testes: In eine Meßküvette von 1 cm Schichtdicke pipettiert man nacheinander

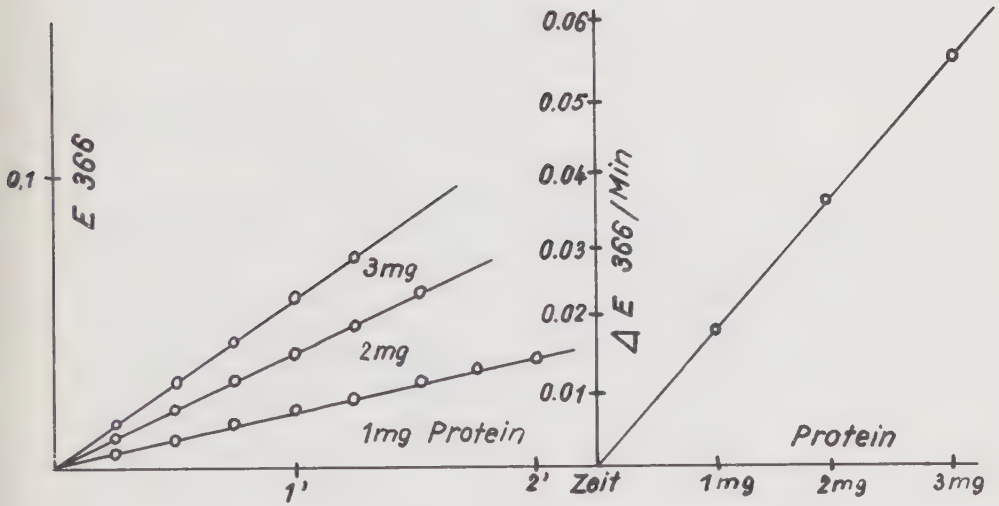
TRAM-Puffer	1,50 ml
TPN-Lösung	0,03 ml
K-Glukose-6-Phosphat-Lösung	0,15 ml
H_2O	0,27 ml

und startet mit

Rohextrakt (ca 1,8 mg Protein) 0,05 ml.

Nach Zusatz des Rohextraktes und Umschütteln der Küvette wird die Extinktionszunahme bei 366 mμ innerhalb 2 Minuten, alle 15 Sekunden ablesend, gemessen, durch 2 geteilt und dann die spez. Aktivität des Enzyms ermittelt. Die lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Proteinmenge ist aus der Abbildung 1.) zu ersehen.

Abbildung 1.) Graphische Darstellung der Kinetik der G-6-PD.



Zu Abbildung 1.) Kinetik der TPNH-Bildung und Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration. Testzusammensetzung s. Text d: 1 cm; t 25 Grad C; λ: 366 mμ.

ATP-Hexosetransphosphatase (oder Hexokinase).
Das 1926 von L. Meyerhof zum ersten Mal beobachtete Enzym katalysiert folgende Reaktion (48):

$$\text{Glukose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glukose-6-Phosphat} + \text{ADP} \quad (2)$$

Zur Messung der ATP-HTP-Aktivität wurde ein zusammengesetzter optischer Test herangezogen, der sich der Oxydation des Glukose-6-Phosphats zu 6-Phosphoglukonsäure mittels eines weitgehend hexokinasefreien G-6-PD-Präparates als Indikatorreaktion bedient. Die Bildung des dabei entstehenden TPNH ist direkt proportional der ATP-HTP-Aktivität und läßt

sich photometrisch leicht verfolgen. Die Gleichung der Gesamtreaktion ist demnach folgendermaßen zu formulieren:

Glukose + ATP + TPN^+ + H_2O $\rightleftharpoons$ 6-Phosphoglukonsäure + TPNH + H^+ + ADP (3)

Reagenzien: 0,2 M Trishydroxymethylaminomethan-(TRIS)-Puffer, pH 7,8, TPN: s. G-6-PD-Test.
0,1 M ATP. Es stand Na_2H-ATP von der Fa. Boehringer zur Verfügung mit einem Reinheitsgrad von 75 %. Die Neutralisation erfolgte mit 2n Kalilauge.
1 M Glukose-Lösung. (Glukose p.a. Merck Nr. 8342)
4 M Kaliumchlorid-Lösung. (KCl p.a. Merck Nr. 4939)
1 M Magnesiumchlorid-Lösung. ($MgCl_2$ p.a. Merck Nr. 5832)
Hexokinasefreie G-6-PD (21;36). Eine weitgehend hexokinasefreie G-6-PD wurde aus Bäckerhefe in einem Anreicherungsverfahren, modifiziert nach A. Kornberg und B.L. Horecker (36) sowie L. Glaser und D.H. Brown (21) gewonnen. Als sehr wirkungsvoller Schritt bei der ATP-HTP-Abtrennung erwiesen sich uns ein Hitzeschritt von einer 15-minütigen Dauer bei 40° C und eine Nukleinsäure-fraktionierung. Das Verhältnis von ATP-HTP zu G-6-PD betrug nach dieser Behandlung in zwei verschiedenen Franktionen 1 zu 200 bzw. 1 zu 110 nach einem Ausgangsverhältnis von 1 zu 2. Zur Stabilisierung wurde das Präparat in 0,25 molarem Glycylglycin-Puffer von pH 2,0 gelöst (21) und behielt in der Kühltruhe aufbewahrt für die Dauer unserer Versuche (3 Monate) seine Aktivität. Bei einem Einsatz von 0,05 ml G-6-PD-Lösung (100 γ Protein) erlangte die Hilfsreaktion des ATP-HTP-Testes eine optimale Geschwindigkeit, denn wie aus der Abbildung 2.) hervorgeht, ist unter diesen Bedingungen die ATP-HTP geschwindigkeitsbestimmend.

Ausführung des Testes: In eine Meßküvette von 1 cm Schichtdicke pipettiert man nacheinander:

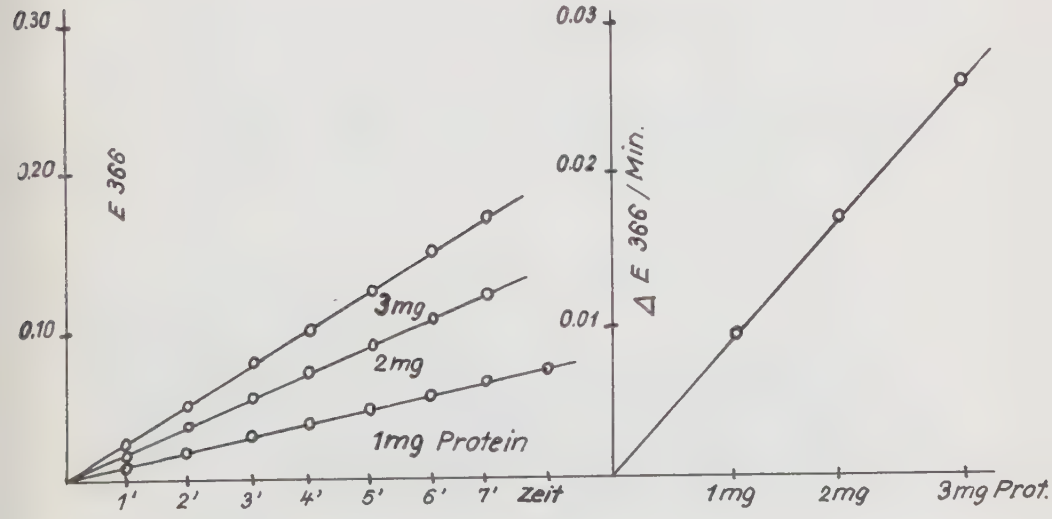
TRIS-Puffer	1,00 ml
TPN-Lösung	0,04 ml
ATP-Lösung	0,05 ml
Glukoselösung	0,20 ml
Kaliumchloridlösung	0,10 ml
Magnesiumchloridlösung	0,02 ml
G-6-PD	0,05 ml
H_2O	0,49 ml

und startet mit

Rohextrakt (ca. 2 mg Protein) 0,05 ml.

Nach Zusatz des Rohextraktes und Umschütteln der Küvette läßt sich bei minütlicher Ablesung die Extinktionszunahme bei der Wellenlänge λ = 366 mμ 7 Minuten lang verfolgen. Der Extinktionszuwachs innerhalb der 7 Minuten wird durch 7 dividiert und dann mit Hilfe der Proteinbestimmung im Rohextrakt die spezifische Aktivität ermittelt. Das Bild zeigt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit dem ATP-HTP-Einsatz proportional ist.

Abbildung 2.) Graphische Darstellung des ATP-HTP-Testes.



Zu Abbildung 2.) Kinetik der TPNH-Bildung bei steigendem ATP-HTP-Einsatz und Abhändigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration. Testzusammensetzung s. Text. d = 1 cm; t = 25 Grad C; λ = 366 mμ.

Milchsäuredehydrogenase: (37;8) (oder DPNH-Pyruvattranshydrogenase) Das Enzym, das 1919 von L. Meyerhof (49) im Muskel entdeckt wurde, katalysiert folgende biochemische Reaktion:

$$\text{DPNH} + \text{H}^+ + \text{Brenztraubensäure} \rightleftharpoons \text{Milchsäure} + \text{DPN}^+ \quad (4)$$

deren Gleichgewicht weit auf der Seite der Reduktion liegt, worauf sich die Bestimmungsmethode stützt, die in der Absorptionsmessung des verschwindenden DPNH besteht. (37)

Reagenzien: 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,6.
0,15 M Na-Salz der BTS. (BTS-Boehringer Nr. 15685)
0,0125 M DPNH. DPNH wurde durch enzymatische Hydrierung mit Hilfe von Alkohol und ADH aus 75 %-igem DPN der Fa. Boehringer (DPN-75 Nr. 15300) hergestellt. (33)

Ausführung des Testes: In eine Meßküvette von 1 cm Durchmesser pipettiert man nacheinander:

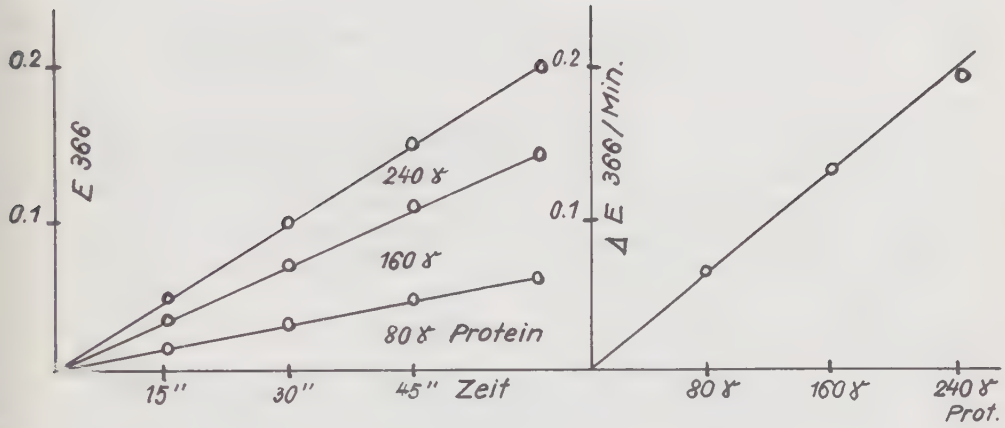
Kaliumphosphat-Puffer	1,50 ml
BTS-Lösung	0,07 ml
DPNH-Lösung (bis zu einem ΔE von 0,8)	0,02 ml
H_2O	0,39 ml

und startet mit

Rohextrakt (ca. 80 γ Protein)	0,02 ml

Nach Umschütteln der Küvette wird die Reaktion 1 Minute lang, zur Kontrolle ihres Verlaufs alle 15 Sekunden ablesend, photometrisch verfolgt. Mit Hilfe des Proteingehaltes des Rohextraktes läßt sich dann leicht die spezifische Aktivität errechnen. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom MDH-Einsatz wird in der Abbildung 3.) graphisch dargestellt.

Abbildung 3.) Graphische Darstellung der Kinetik des MDH-Testes.



Zur Abbildung 3.) Kinetik der DPNH-Bildung bei steigendem MDH-Einsatz und Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration. Testzusammensetzung s. Text. d = 1 cm; t = 25 Grad C; λ = 366 mμ

Citrat-Condensing-Enzym (Oder kondensierende Acetyl-CoA-Oxalacetat-Transacetylase). (53)

Das 1951 von J. Stern und S. Ochoa (53) aus Taubenleber dargestellte Enzym schleust die aktivierte Essigsäure in den Citronensäure-Cyklus ein. Die reversible Enzymreaktion, deren Gleichgewicht weit auf der Seite der Citratbildung liegt, ist folgendermaßen zu formulieren:

Oxalessigsäure + Acetyl-CoA + $H_2O \rightleftharpoons$ Citronensäure + CoA-SH (5)

Die Reaktion läßt sich optisch verfolgen, wenn man sie mit der Oxydation von Äpfelsäure durch ÄDH und mit DPN als Wasserstoffacceptor koppelt:

$$\text{Äpfelsäure} + \text{DPN}^+ \rightleftharpoons \text{Oxalessigsäure} + \text{DPNH} + \text{H}^+ \quad (6)$$

Gesamtreaktion:

$$\text{Acetyl-CoA} + \text{Äpfelsäure} + \text{DPN}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Citronensäure} + \text{CoA-SH} + \text{DPNH} + \text{H}^+$$

Unbeeinflußt liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion sehr weit auf der Seite der Äpfelsäure, wird aber in Anwesenheit von CDE und Acetyl-CoA in Richtung auf die Oxalessigsäure verschoben, daß also zur Bildung bestimmter Citronensäuremengen äquimolare Mengen von Äpfelsäure unter DPNH-Produktion zur Oxalessigsäure oxydiert werden, was optisch gemessen werden kann.

Reagenzien: 0,1 M TRIS-Puffer, pH 7,28.
0,05 M Äpfelsäure (p.a. Merck Nr. 282) Die Äpfelsäure wurde mit 2n Kalilauge neutralisiert.
0,02 M DPN (DPN-75, Boehringer Nr. 15300).
0,002 M Acetyl-CoA. Das Acetyl-CoA wurde aus einem Quecksilbersalz des CoA-SH nach D. Shemin und E.J. Simon hergestellt (62). Nach Zerlegen des Hg-Salzes durch H_2S und Reinigung des freien Coenzyms im Kationen-Austauscher (Amberlite I.R. 120), einer weiteren Ausfällung mit $AgNO_3$ (1,5 ml 30 %-iges $AgNO_3$ pro Gramm Hg-Salz) und dann daran angeschlossener Zerlegung mit H_2S wird das weitgehend gereinigte Coenzym mit frisch destilliertem Essigsäureanhydrid umgesetzt (bei pH 8,0) unter fortwährender Kontrolle der noch freien funktionellen SH-Gruppen mit Hilfe des Nitroprussidtestes nach R. Grunert und E.H. Philipps (24). Essigsäureanhydrid wird unter pH-Kontrolle bis zum Verschwinden der freien SH-Gruppen zugetropft. Durch Gefriertrocknung erhält man ein stabiles Pulver, dessen Acetyl-CoA-Gehalt mittels des CDE-Testes und der Acetylierung von p-Nitroanilin, einer durch Arylaminacetylase aus Taubenleber katalysierten Reaktion (67), mit übereinstimmenden Ergebnissen gemessen wurde. Die Ausbeute aus 5 g Quecksilbersalz betrug 90,3 μMol Acetyl-CoA.

Äpfelsäuredehydrogenase. Das Enzym wurde aus Schweineherzen nach einer Vorschrift von R. Athenstädt (1) gewonnen und erreichte in zwei Kristallfraktionen eine spezifische Aktivität von 10300 bzw. 29600 Einheiten/mg Protein.

In 70 %-iger Ammonsulfatlösung suspendiert behielten die Kristalle in der Kühltruhe aufbewahrt ihre Aktivität mindestens für drei Monate.

Ausführung des Testes: In eine Meßküvette von 1 cm Schichtdicke pipettiert man nacheinander

TRIS-Puffer	1,00 ml
Kaliummalat-Lösung	0,60 ml
Acetyl-CoA-Lösung	0,10 ml
DPN-Lösung	0,10 ml
ÄDH-Präparat	0,02 ml
H_2O	0,17 ml

schüttelt dann die Küvette um, wartet etwa zwei Minuten bis zur Einstellung des Gleichgewichts der Hilfsreaktion, und startet dann mit

Rohextrakt (ca. 400 γ Protein) 0,01 ml.

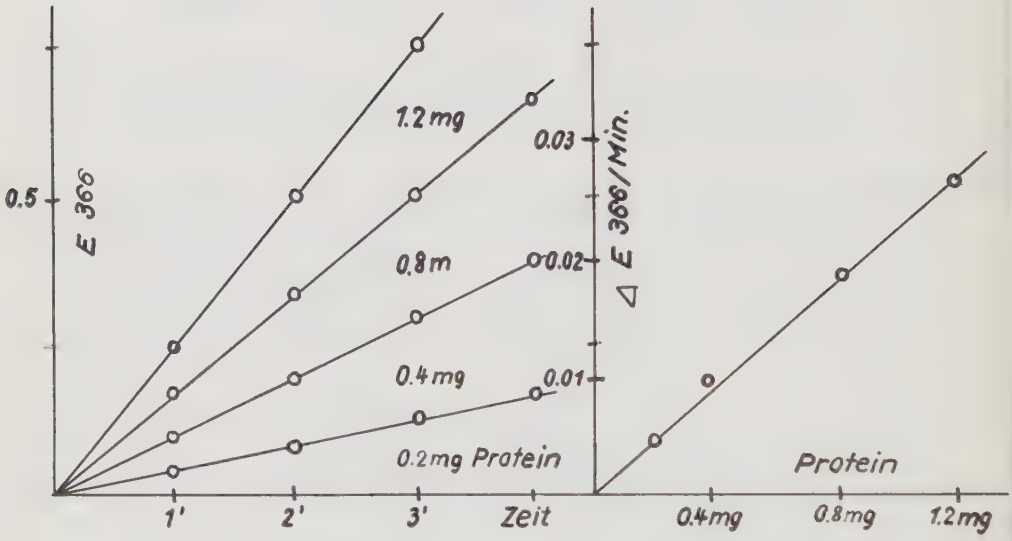
Nach erneutem Umschütteln verfolgt man die DPNH-Bildung photometrisch drei Minuten lang wie es bei ähnlichen Testen vorher beschrieben wurde. Der abgelesene Extinktionszuwachs wird durch drei geteilt und dann mit Hilfe des ermittelten Proteingehaltes die spezifische Aktivität errechnet. Die Abbildung 4.) stellt die Kinetik der Reaktion dar.

β-Ketothiolase (76)

Das von F. Lynen isolierte und analysierte Enzym katalysiert folgende Reaktion im Fettsäure-Cyklus:

$$\beta\text{-Ketoacyl} \sim \text{S-CoA} + \text{CoA-SH} \rightleftharpoons \text{Acyl} \sim \text{S-CoA} + \text{Acetyl} \sim \text{S-CoA} \quad (7)$$

Abbildung 4.) Graphische Darstellung der Kinetik des CDE-Testes.



Zur Abbildung 4.) Kinetik der DPNH-Bildung bei steigendem CDE-Einsatz und Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration. Testzusammensetzung s. Text. d = 1 cm; t = 25 Grad; λ = 366 m μ

Um die Ketothiolase-Reaktion optisch verfolgen zu können, macht man Gebrauch von der spezifischen Absorption des Magnesiumenolates der β-Ketoacyl-CoA-Derivate bei λ = 313 mμ. Anstelle des natürlichen Substrats verwendet man einfacher gebaute Modellsubstanzen, die leichter herzustellen sind und von störenden Deacylasen kaum angegriffen werden, für das β-Ketoacyl-CoA das Acetacetyl-Pantethein und für das CoA-SH das Pantethein (46).

Reagenzien: 0,2 M TRIS-Puffer, pH 7,5; mit einer 0,2 M Konzentration von $MgCl_2$.
0,05 M AAP
0,05 M Pantethein.

Ausführung des Testes: In eine Meßküvette aus Quartz von 1 cm Schichtdicke pipettiert man nacheinander

TRIS-Puffer	1,40 ml
AAP	0,028 ml
H_2O	0,142 ml
Rohextrakt (ca. 150 Protein)	0,03 ml

wartet dann, bis der durch nicht fermentative Spaltung von AAP bedingte Leerlauf nach ca. 5 - 8 Minuten konstant bleibt und startet mit

Pantethein	0,02 ml.

Nach Umschütteln der Küvette beobachtet man die Extinktionsabnahme bei der Wellenlänge λ= 313 mμ entsprechend der thiolytischen Spaltung von AAP, indem man die Reaktion 3 Minuten lang alle 30 Sekunden ablesend verfolgt, wie aus der Abbildung 5.) zu ersehen ist. Die spezifische Aktivität erhält man, indem man die gemessene Extinktionsabnahme durch 3 dividiert und den erhaltenen Wert mit dem Proteingehalt des Rohextraktes in Beziehung setzt.

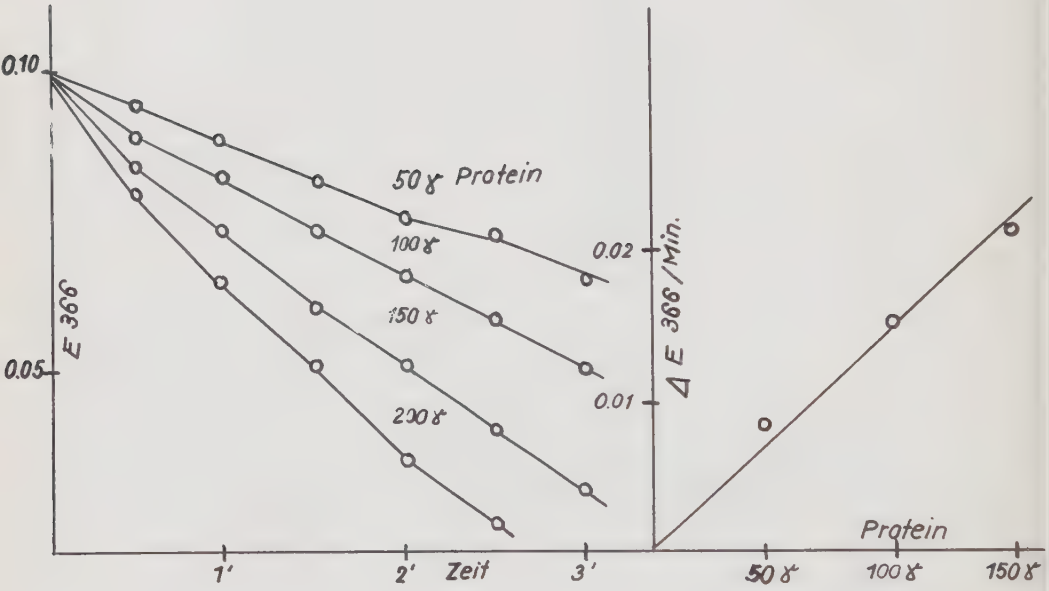
β-Hydroxyacyldehydrogenase (76)

Die ebenfalls von F. Lynen aufgeklärte Enzymreaktion des Fettsäurecyklus ist durch folgende Gleichung zu charakterisieren:

$$\beta\text{-Ketoacyl} \sim \text{S-CoA} + \text{DPNH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \beta\text{-Oxyacyl} \sim \text{S-CoA} + \text{DPN}^+ \quad (8)$$

Für die Überlassung folgender Testsubstanzen sind wie Herrn Prof. F. Lynen zu großem Dank verpflichtet: AAP, AAC, Pantethein u. Hg-CoA!

Abbildung 5.) Graphische Darstellung des β-KTH-Testes.



Zur Abbildung 5.) Kinetik der AAP-Abnahme bei steigendem Thiolase-Einsatz und Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration. Testzusammensetzung s. Text. d = 1 cm; t = 25 Grad C; λ = 366 mμ

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der β-Hydroxyacyldehydrogenase wird die Extinktionsabnahme bei λ = 366 mμ entsprechend dem Verbrauch von DPNH zur Reduktion der Ketoverbindung photometrisch registriert. Als Substrat läßt sich die leicht zugängliche Modellsubstanz Acetacetyl-Cysteamin verwenden (38;47).

Reagenzien: 0,05 M Natriumpyrophosphat-HCl-Puffer pH 7,65.
0,0125 M DPNH (s. MDH-Test).
0,1 M AAC, S.S, 13.

Ausführung des Testes: In eine Meßküvette von 1 cm Schichtdicke pipettiert man nacheinander

Pyrophosphat-Puffer	1,40 ml
DPNH-Lösung (bis zu einem ΔE von 0,8)	0,02 ml
Rohextrakt (ca. 1,8 mg Protein)	0,05 ml
H_2O	0,48 ml

schüttelt die Küvette um und verfolgt einen möglichen Vorlauf bis zum Stillstand oder bis eine konstante Geschwindigkeit erreicht ist und startet dann mit

AAC	0,05 ml

Nach Umschütteln der Küvette mißt man wie bei allen DPNH-abhängigen Reaktionen die Kinetik, indem man hier alle 30 Sekunden 2,5 Minuten lang die Extinktionsabnahme registriert. Der gemessene Wert wird durch 2,5 dividiert und zur Errechnung der spezifischen Aktivität mit dem Proteingehalt des Rohextraktes in Beziehung gesetzt. Die Abbildung 6.) zeigt das entsprechende Meßergebnis.

Glutemat-Oxalacetat-Transaminase. (7)

Die durch dieses Enzym katalysierte Reaktion verläuft nach folgender Gleichung, deren Gleichgewicht weitgehend auf der linken Seite liegt:

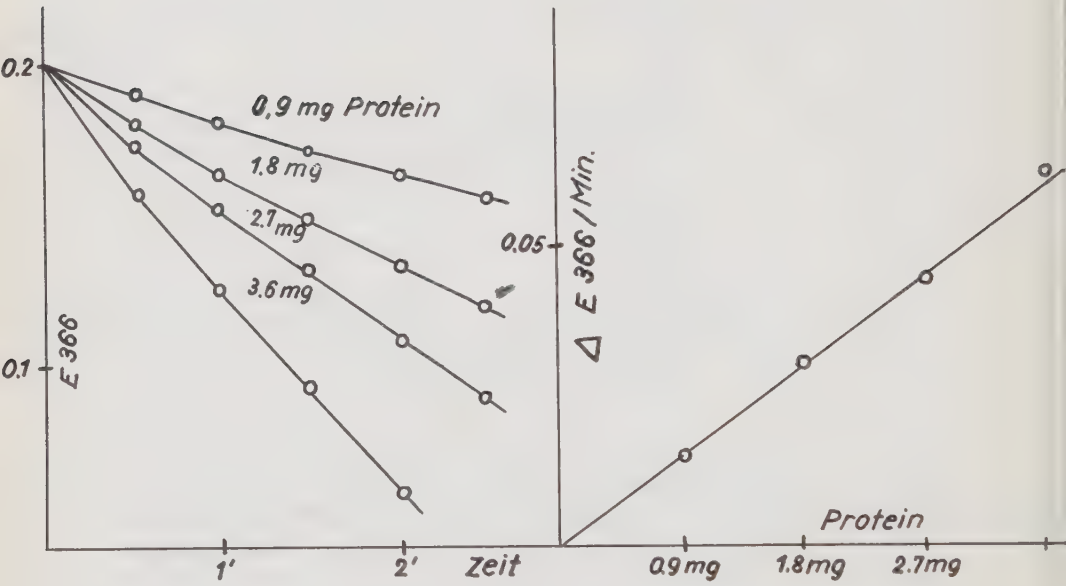
Glutaminsäure + Oxalessigsäure $\rightleftharpoons$ Asparaginsäure + α-Ketoglutarsäure (9)

Die sich anstauende Oxalessigsäure läßt sich leicht mit ÄDH und DPNH als Wasserstoffdonator zur Äpfelsäure reduzieren und quantitativ aus der vorgelagerten Gleichgewichtsreaktion entfernen,

$$\text{Oxalessigsäure} + \text{DPNH} + H^+ \rightleftharpoons \text{Äpfelsäure} + \text{DPN}^+ \quad (10)$$

sodaß bei genügendem ADH-Einsatz die GOT geschwindigkeitsbestimmend ist und entsprechend der DPNH-Abnahme in ihrer Kinetik photometrisch verfolgt werden kann.

Abbildung 6.) Graphische Darstellung der Kinetik des β-HAD-Testes.



Zur Abbildung 6.) Kinetik der DPNH-Abnahme bei steigendem β-HAD-Einsatz und Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration. Testzusammensetzung s. Text. d = 1 cm; t = 25 Grad C; λ = 366 mμ .

Reagenzien: 0,1 M Kalium-Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,4.
0,0125 M DPNH, s. MDH-Test.
0,125 M Na-α-Ketoglutarat (α-KGS Boehringer Nr. 15673
1 M Asparaginsäure (Asparaginsäure reinst, Fa. Th. Schuchardt, München). Die Säure wurde mit KOH-Plätzchen neutralisiert.
ÄDH-Präparat s. CDE-Test.

Ausführung des Testes: In eine Meßküvette von 1 cm Schichtdicke pipettiert man nacheinander

Phosphatpuffer	1,30 ml
DPNH-Lösung (bis zu einem Δ E von 0,8)	0,02 ml
Asparaginat-Lösung	0,07 ml
ÄDH-Präparat	0,02 ml
Rohextrakt (ca. 400 γ Protein)	0,01 ml
H_2O	0,48 ml

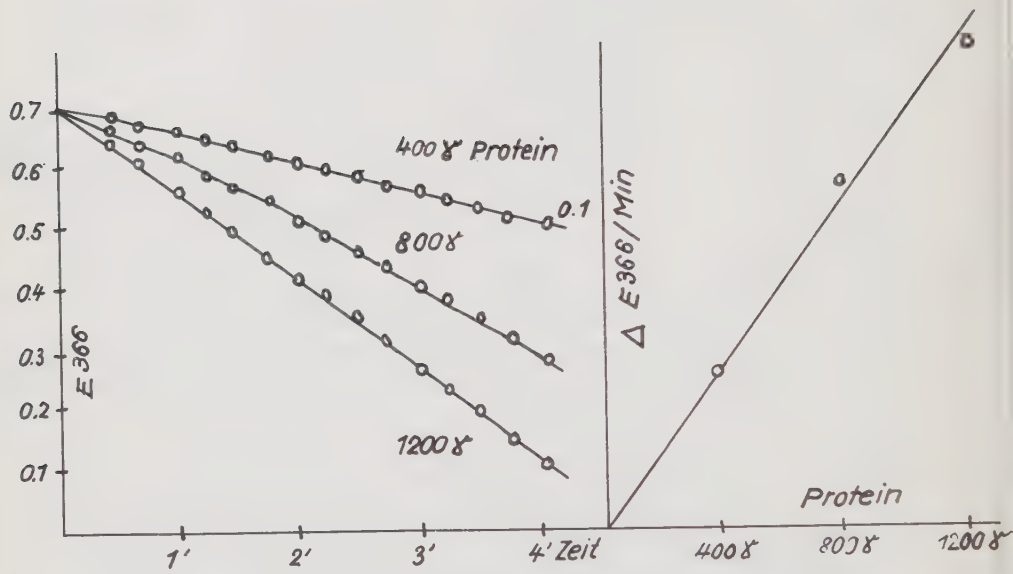
schüttelt um, wartet, bis in ca. 10 Minuten die durch den Rohextrakt eingeschleppten Substrate (BTS, α-KGS, GTS) mit DPNH und den entsprechenden Enzymen MDH, GOT und Glutaminsäuredehydrogenase abreagiert sind und startet mit

α-Ketoglutarat-Lösung 0,10 ml.

Nach Umschütteln der Küvette wird die Reaktionskinetik wiederum bei der Wellenlänge λ = 366 mμ entsprechend dem Verschwinden von DPNH 4 Minuten lang verfolgt, wobei alle 15 Sekunden die Extinktionsänderung festzustellen ist. Die gemessene Extinktionsabnahme wird durch 4 geteilt und zur Ermittlung der spezifischen Aktivität mit dem Proteingehalt des Rohextraktes in Beziehung gesetzt.

Zur Verdeutlichung des Testes dient Abbildung 7.).

Abbildung 7.) Graphische Darstellung der Kinetik des GOT-Testes.



Zur Abbildung 7.) Kinetik der DPNH-Abnahme mit steigendem GOT-Einsatz und Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration. Testzusammensetzung s. Text. d = 1 cm; t = 25 Grad C; λ = 366 mμ

Substratmessungen:

Glukose. Zur Messung des Glukosegehaltes im Blut und in der Durchströmungsflüssigkeit aus Meerschweinchenleber wurde die Methode von H.C. Hagedorn und B.N. Jensen (26) in einer Modifikation von K.H. Garbade herangezogen. Das Blut wurde aus der Dekapitationswunde bzw. durch Inzision aus der mit warmem Wasser erweiterten Schwanzvene des Untersuchungstieres entnommen. (18)

Leberblutgehalt. Der Blutgehalt der Lebern von Ratten und Mäusen wurde nach H. Holzer, J. Sedlmeyer und M. Kiese gemessen (34).

Milchsäure. Der Milchsäurespiegel der Durchströmungsflüssigkeit aus Meerschweinchenlebern wurde teils nach der enzymatischen Methode nach O. Wieland (78), die sich einer DPN-unabhängigen MDH aus Hefe bedient, teils nach der kolorimetrischen Methode von S.B. Barker und W.H. Summerson bestimmt (4).

Acetessigsäure. Dieses Substrat wurde bestimmt nach der Methode von O. Walker (71).

Phosphorsäure. Das anorganische Phosphat wurde bestimmt nach der Molybdänblaumethode von C.H. Fiske und J. Subarow in einer Modifikation von K.H. Garbade (17;19).

Eosin. Tetrabromfluoreszin hat ein Absorptionsmaximum bei λ= 510 mμ und läßt sich somit leicht bei der Wellenlänge λ = 509 mμ der Cadmiumlampe im Photometer Eppendorf bestimmen. Die Durchströmungsflüssigkeit wurde von der Messung zur Ausschaltung einer möglichen Trübung scharf abzentrifugiert und der Eosingehalt nach einer Eichkurve aus der Extinktion ermittelt.

Protein. Im allgemeinen wurde die Proteinbestimmung nach der Biuretmethode durchgeführt (6) oder im Falle hochgereinigter Enzympräparate nach der empfindlichen Methode von O. Lowry (45).

Glykogen. Das Leberglykogen wurde nach der leicht modifizierten Methode von L. Gyermek und G. Fekete bestimmt (25).

Serumelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe der Papierelektrophorese in der Elphor-H-Apparatur nach W. Grassmann und K. Hannig (23) in 0,02 M Veronalpuffer vom pH 8,7 bei einer Spannung von 110 Volt und einer Laufzeit von 12 - 16 Stunden. Nach Anfärben des Proteins mit Amidoschwarz B 10 wurde das Elektropherogramm mit einem Direktschreiber transparenzphotometrisch graphisch dargestellt und danach planimetrisch ausgewertet. Die Bezeichnung der einzelnen Banden erfolgte in Analogie zu den Befunden beim menschlichen Serum.

Versuchstiere

Zur Untersuchung der Leberenzyme wurden Inzuchtmäuse gleichen Geschlechts aus einem virusfreien Stamm von Dr. Munk, II. Medizinische Universitätsklinik München, verwendet. Die Ernährungsbedingungen (Hafer, Brot und Wasser nach Belieben) blieben während der Zeit der Versuche konstant. Die Tiere mit einem Durchschnittsgewicht von 25 g wurden jeweils in Gruppen zu fünf mit 4 γ Phalloidin pro g Maus (= DL 100) subcutan vergiftet (Injektionslösung: 500 γ kristallisiertes Phalloidin pro ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung) und nach 60 Minuten kurz vor Eintritt des Todes durch Scherenschlag dekapitiert. Das Blut wurde für Elektrophoreseversuche zur Gewinnung von hämolysefreiem Serum in paraffinierten Zentrifugengläsern vereint aufgefangen, die Leber möglichst rasch in toto herauspräpariert und sofort in einem Thermogefäß mit flüssiger Luft 30 Minuten durchgefroren.

Die zur Enzymbestimmung verwendeten Rohextrakte erhielten wir durch Homogenisieren der Mäuselebern im Potter-Elvehjem-Homogenisator (55) mit 0,05 M sekundärem Kaliumphosphat im Verhältnis 1 : 4. Um ein möglichst klares Filtrat zu gewinnen, wurde das Homogenat anschließend eine Stunde bei 15000 U.p.M. und 0 Grad zentrifugiert und zusätzlich zur Fettabsonderung durch Glaswolle filtriert. Der pH-Wert der Rohextrakte lag zwischen pH 7,0 und 7,5. Eine Fünfergruppe von Kontrolltieren wurde jeweils in einem Arbeitsgang gemeinsam behandelt.

Bei den Experimenten, die den Einfluß des Alloxandiabetes auf die Phalloidinvergiftung analysieren sollten, dienten Sprague-Dawley-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 200 bis 250 g als Versuchstiere. Während der Zeit der Versuche wurden die Tiere unter konstanten Ernährungsbedingungen gehalten (Hafer, Brot und Wasser nach Belieben).

Der Diabetes wurde durch einmalige i.v.-Injektion von 60 bis 70 mg Alloxan pro kg Ratte erzeugt. Die Injektionslösung, 4 %-iges Alloxan in 0,9 %-igem NaCl mit wenigen Tropfen 2n Kalilauge auf ein pH von 6,5 gebracht, wurde in einem Eisbad hergestellt und für die Dauer der Benutzung bei einer Temperatur von 4 Grad C gehalten. Die Tiere reagierten recht unterschiedlich. Im günstigsten Falle stellte sich bei 50 % ein starker Diabetes ein, der sich an einer deutlichen Harnvermehrung und der Blutzuckererhöhung nachweisen ließ. 30 % der Tiere starben am zweiten Tag nach der Alloxanvergiftung und 20 % blieben unbeeinflußt. Der Diabetes mit einem Blutzuckergehalt von durchschnittlich 500 mg %

blieb bis zur Phalloidinvergiftung 3 Wochen lang konstant und ließ sich nachher noch 7 Tage lang verfolgen. Eigenartigerweise konnten wir bei unseren Versuchstieren teilweise keine Gewichtsabnahme, eher eine Gewichtsvermehrung beobachten.

ERGEBNISSE

Einfluß der Phalloidinvergiftung auf verschiedene Leberenzyme

Die untersuchten Mäuse zeigten im Laufe der Vergiftung regelmäßig folgende charakteristischen nacheinander auftretenden Vergiftungszeichen: Tachypnoe, anämisches Erblassen von Augen und Ohren, und in kurzen Abständen auftretende typische Krampferscheinungen, als ob man die Tiere aufschreckte. In einem Falle bildete sich an der rechten Hinterpfote eine schlaffe Lähmung aus. Nach Dekapitation waren aber die reflektorischen Laufbewegungen an den Hinterbeinen auslösbar. Es handelte sich demnach wohl um eine hochgelegene zentrale Lähmung. Bei Eröffnung des Bauchraumes zeigte sich das Splanchnikusgebiet im Vergleich zu den Kontrollen blutüberfüllt und die Leber deutlich vergrößert und ebenfalls blutreicher. Nach vorsichtiger Eröffnung der Schädelkapsel bemerkte man eine auffallend livide Verfärbung des Gehirns mit vermehrter Gefäßinjektion, offenbar als Ausdruck eines Hirnoedems.

Bei der Messung des Hämatokritwertes ergab sich eine erhebliche Zunahme bei den vergifteten Tieren, und zwar von 56 % im Normalfall auf 64 %.

Eine generelle Angabe über die sicher tödlich wirkende Dosis (DL 100) läßt sich nicht machen, weil die Reaktion der einzelnen Tierstämme sehr verschieden ist. Im allgemeinen läßt sich doch sagen, daß mit 2 γ Phalloidin pro g Maus behandelte Tiere nach anfänglich schweren Vergiftungserscheinungen, wie eben beschrieben, sich vollzählig erholen und überleben. In den Lebern der überlebenden Tiere finden sich ausgedehnte hämorrhagische Bezirke. Eine Dosis von 3 γ pro g Maus wirkte nur teilweise und dann nach ca. 4 Stunden tödlich.

Unser Hauptinteresse galt wie einleitend erwähnt dem Verhalten verschiedener Enzyme des Kohlehydrat- Fett und Eiweißstoffwechsels im Leber-

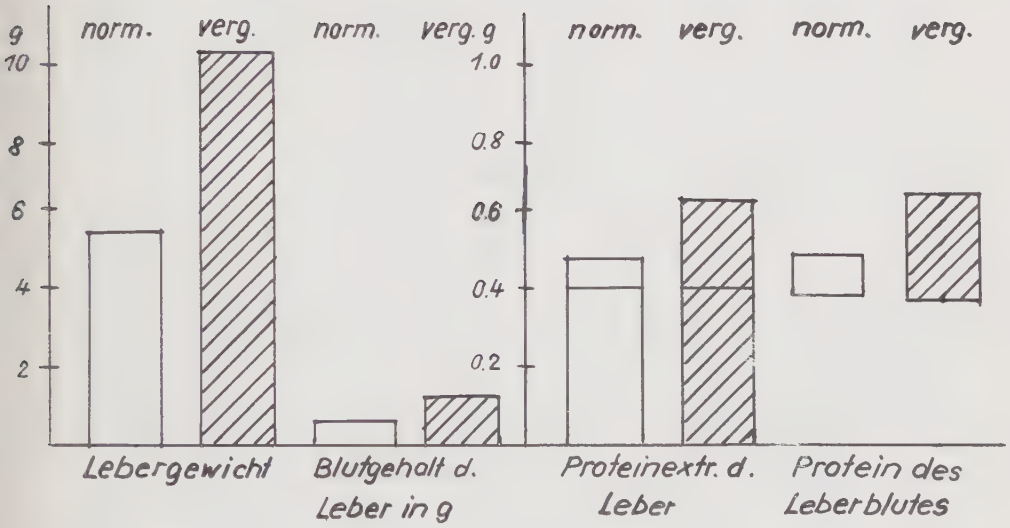
parenchym. Im einzelnen wurde die Aktivität von G-6-PD, MDH, ATP-HTP, CDE, β-HAD, β-KTH, GOT bestimmt. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen, deren Durchführung im einzelnen im methodischen Teil beschrieben wurde, sind in der Tabelle 1.) zusammengefaßt.

Wie alle Untersucher, die das Verhalten von Leberenzymen unter den verschiedensten Bedingungen studierten, sahen wir uns der Frage nach einer konstanten Bezugsgröße gegenübergestellt. Das Trocken- und Feuchtgewicht steigt während der Phalloidinvergiftung innerhalb einer Stunde so stark an, daß es von vornherein als Bezugsgröße ausfällt. Die Relation zum Tiergewicht ist so allgemeiner Natur, daß es nur im äußersten Falle als Grundlage dienen sollte. Am genauesten erscheinen die Angaben über die verschiedenen Enzymaktivitäten, wenn sie auf die extrahierte Proteinmenge bezogen werden. Dabei ist folgendes zu beachten: aus den vergifteten Organen läßt sich infolge der Blutanschoppung mehr Protein extrahieren als aus den entsprechenden Kontrollorganen, was bei der Berechnung der spezifischen Aktivität die Werte fälschend herabsetzen würde. Setzt man voraus, daß in beiden Fällen das aktive Protein völlig extrahiert ist, was sich durch das vorhergehende Einfrieren der Lebern erleichtern läßt, so kann das Mehr im Proteinextrakt bei den vergifteten Lebern nur aus dem enzymatisch weitgehend inaktiven Eiweiß (Hämoglobin + Serumprotein = ca. 200 mg pro ml Blut (15) des Leberblutes stammen, das nach der Vergiftung um ein Vielfaches vermehrt ist. Siehe Abbildung 8)

Korrigierend muß man dann die spezifischen Enzymaktivitäten der vergifteten Organe in Bezug auf den Mittelwert der Proteinextrakte der Kontrollen errechnen, ausgenommen die Aktivität der ATP-HTP und der G-6-PD, die im Blut in annähernd gleicher Konzentration wie in der Leber vorkommen.

Betrachtet man nun das Verhalten der untersuchten Enzyme, so findet man auffallende Veränderungen. Als einziges erscheint die MDH unbeeinflußt. Deutliche Aktivitätsverminderung mißt man beim CDE (- 42 %), der GOT (- 33,4 %), den beiden getesteten Enzymen des Fettsäurecyklus (β-HAD, - 36,0 %; β-KTH, - 27,0 %) sowie der G-6-PD (- 14,3 %) und der ATP-HTP (- 13,4 %).

Abbildung 8.) Einfluß des Leberblutproteins auf den Gesamtproteinextrakt der Leber.



Zur Abbildung 8.) Die Abbildung ist nach den Ergebnissen der Bestimmung von Lebergewicht, Leberblutgehalt und Proteingehalt der Organextrakte von 10 phalloidinvergifteten Mäusen und den entsprechenden Kontrollen hergestellt. Ein Proteingehalt von 210 mg pro ml Vollblut wurde nach (15) zugrundegelegt. Es ist deutlich, daß der Proteinanstieg im Rohextrakt der vergifteten Lebern durch die starke Blutanschoppung zu erklären ist.

Tabelle 1.) Das Verhalten verschiedener Enzyme in den Lebern phalloidinvergifteter Mäuse. Die Zahlen bedeuten Enzymeinheiten pro mg Protein.

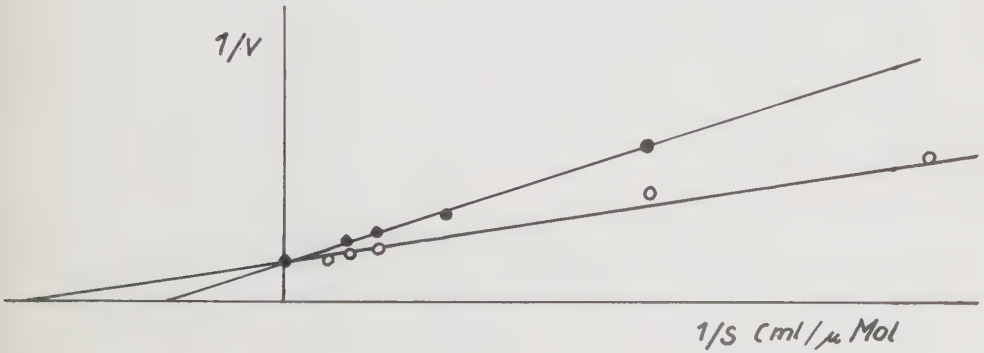
Zahl d. Mäuse		Lebergesamtgew.		Gesamtproteinextr.		Leberblutgeh.	
Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere
5	5	5,2 g	10,2 g	695 mg	860 mg	6,75 %	12,0 %
7	6	9,2 g	11,6 g	490 mg	690 mg		
5	5	5,5 g	9,8 g	495 mg	695 mg		
5	5	5,6 g	8,5 g	412 mg	563 mg		
5	5	5,2 g	8,4 g	405 mg	560 mg		
5	5	5,4 g	9,0 g	515 mg	650 mg		
5	5	6,1 g	8,5 g	410 mg	500 mg		
-	-	1,14 g	1,86 g	490 mg	637 mg	6,75 %	12,0 %

G-6-PD		ATP-HTP		MDH		CDE	
Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere
18,2	18,7	6,6	4,6	1440	1960	50,0	49,0
15,4	4,8	-	-	1130	-	49,0	29,0
21,6	16,8	6,8	6,1	1300	1360	59,0	46,0
18,7	13,8	6,1	5,3	1130	1230	60,0	24,0
20,1	14,1	7,5	6,2	810	950	93,0	41,0
17,2	15,2	4,7	5,2	1100	960	71,0	36,0
11,3	12,2	8,6	7,4	3360	3300	50,0	32,6
						54,5	37,0
						50,0	25,0
17,95	15,2	6,7	5,8	1490	1620	60,0	35,0
	- 14,3 %		- 13,4 %		+ 8,6 %		- 42,0 %

GOT		β-HAD		β-KTH	
Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere
2940	3060	12,6	15,9	140	179
3240	1690	15,4	15,9	224	125
3500	3000	16,4	14,7	260	250
3700	1620	18,6	9,45	176	112
2880	1370	29,0	15,1	204	156
2540	1750	25,8	11,2	240	109
4300	2850	58,0	36,0	370	200
3300	2200	25,0	16,0	220	161
	- 33,4 %		- 36,0 %		- 27,0 %

Auf der Suche nach einer Erklärung für die Aktivitätsverminderung bestimmten wir im Falle des CDE die Michaelis-Konstante für Acetyl-CoA und erhielten zu unserer Überraschung übereinstimmend in drei Messungen eine signifikante Frniedrigung der Konstante, was einer Erhöhung der Affinität des Enzyms zu diesem Substrat gleichkommt. In der Auswertung nach H. Lineweaver und D. Burk (42) beträgt die Abnahme 42,0 % von 6,41 x 10^{-5} Mol/Liter auf 3,7 x 10^{-5} Mol/Liter. Zur Verdeutlichung dient die Tabelle 2.) und die Abbildung 9.). Die Meßergebnisse fallen in den Bereich der in der Literatur angegebenen Daten. Für das Enzym aus Schweineherzmuskel gibt S. Ochoa (53) einen Wert von D = 2 x 10^{-4} Mol/Liter an.

Abbildung 9.) Michaelis-Konstante des CDE für Acetyl-CoA.



Zur Abbildung 9.) Bestimmung der Michaelis-Konstante des CDE für Acetyl-CoA. Die graphische Darstellung der Meßergebnisse erfolgte nach der Auswertung von H. Lineweaver und D. Burk. Kontrolle:
bei Vergiftung:

Tabelle 2.) Bestimmung der Michaelis-Konstante des CDE für Acetyl-CoA aus Leberrohextrakten ausgewertet nach H. Lineweaver und D. Burk (42). Die Tabelle zeigt den Einfluß der Phalloidinvergiftung auf die Konstante. Die Werte bedeuten D = Mol/Liter.

Versuchs-Nr.	Kontrolltiere	vergiftete Tiere
1.	$5,9 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-5}$
2.	$6,65 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-5}$
3.	$6,7 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-5}$
	$6,41 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-5}$
		- 42,0 %

DISKUSSION

Bei der Beurteilung der gefundenen Veränderungen im Leberparenchym erhebt sich zunächst die Frage, ob diese Ergebnisse auf eine spezifische Wirkung des Phalloidins zurückzuführen sind oder ob die Schwankung der Enzymaktivitäten eine allgemeine Reaktion des Organismus auf die verschiedensten Einflüsse darstellen. Die Arbeiten zahlreicher Autoren sind den Modifikationen des Enzymspektrums vornehmlich von Leber und Blutserum unter den heterogensten experimentellen und klinischen Bedingungen gewidmet. Wir haben zum Vergleich alle uns zugänglichen Befunde zu dieser Problemstellung zusammengetragen und tabellarisch dargestellt. (s. Tabelle Nr. 3).

Auffallend ist dabei, daß die Veränderungen unabhängig von Ort und Art der Beeinträchtigung des Organismus in Leber und Blutserum sowohl im Sinne einer Steigerung als auch im Sinne einer Erniedrigung der Enzymaktivität auftreten.

Tabelle 3.) Verhalten verschiedener Enzyme in Leber und Blutserum unter verschiedenen experimentellen und klinischen Bedingungen.

Experimentelle, klin. Bedingung	Name des Enzyms	Aktivität i. d. Leber	Aktivität i. d. Serum	Autor
Extrahepatische Schäden:				
Einfluß des Hungers	Phosphorylase	vermind.	------	(56)
	Xanthinoxydase	vermind.	------	(41, 43, 44, 50, 75, 80)
	Succinodehydrogen.	vermind.	------	(54, 3, 51)
	DPN-Cytochrom-reduktase	vermind.	------	(70)
	Arginase	vermind.	------	(3, 35, 39, 50)
	Katalase	vermind.	------	(50)
	alk. Phosphatase	vermind.	------	(16)
	Esterase	vermind.	------	(3, 50)
	Cholinoxydase	vermind.	------	(3)
	Transaminase	vermind.	------	(2)
	Cytochromoxydase	vermehrt	------	(59)
Alloxandiabetes	ß-Ketothiolase	vermehrt	------	(76)
	ß-Oxyacyldehydrogen.	vermehrt	------	(76)
	Acyldehydrogenase	vermehrt	------	(76)
	Succinodehydrogen.	vermehrt	------	(13)
	anaerobe Glykolyse	vermehrt	------	(13)
	Citronensäurecyklus	vermehrt	------	(13)
	Transaminase	vermehrt	------	(13)
Herzinfarkt, Endarteriitis obliterans	Transaminase	------	vermehrt	(40, 27)
	Cytochromoxydase	------	vermind.	(60)
	ATP-ase	------	vermind.	(60)
	Phosphatase	------	vermind.	(60)
	Hexokinase	------	vermind.	(60)
Paratyphus, Enteritis, Herzinfarkt, Meningitis, nach Operation	Milchsäuredehydrogen.	------	vermehrt	(27)
	Aldolase	------	vermind.	(27)
	Tributyrinase	------	vermind.	(27)
	Cholinoxydase	------	vermind.	(27)
Angina pectoris, perniciöse Anämie	Milchsäuredehydrogen.	------	vermehrt	(31)
Exptl. Typhusvaccination, exptl. Diphtherieintox., exptl. Fremdkörperitonitis, exptl. Pasteurelleninfektion, Muskelquetschung, Tuberkulose	Milchsäuredehydrogen.	vermehrt	------	(28)
	Aldolase	vermind.	------	(28)
	Glutaminsäuredehydr.	vermind.	------	(28)
	Tributyrinase	vermind.	------	(28)
	Cholinoxydase	vermehrt	------	(28)
bei Leberschäden:				
durch Tetrachlor-kohlenstoff	Aldolase	vermind.	vermehrt	(11)
	Phosphohexose-isomerase	vermind.	vermehrt	(11)
	Amylase	unbeeinfl.	unbeeinfl.	(11)
	Tributyrinase	vermind.	unbeeinfl.	(11)
	alk. Phosphatase	vermind.	unbeeinfl.	(11)
	saure Phosphatase	vermind.	------	(11)
	Hexokinase	------	unbeeinfl.	(11)
	Fruktokinase	------	unbeeinfl.	(11)
	Succinodehydrogen.	vermind.	------	(68, 81)
	Cytochromoxydase	vermind.	------	(68)
	Katalase	vermehrt	------	(64)

durch Bleisalz, durch Alkohol	Katalase	vermind.	------	(64)
durch Phenylhydrazin, Allylformiat	Succinodehydrogen.	vermind.	------	(64)
	Katalase	vermind.	------	(64)
durch Thioacetamid	Succinodehydrogen.	vermind.	------	(64)
	Katalase	vermehrt	------	(64)
durch Chloroformnarkose	Katalase	vermehrt	------	(64)
Hepatitis epidemica	Milchsäuredehydrog.	unbeeinfl.	vermehrt	(31, 61)
	Glycerophosphat-dehydrogenase	vermind.	vermehrt	(31, 61)
	Arginase	------	vermehrt	(31, 61)
	Äpfelsäuredehydrog.	------	vermehrt	(31)
	Sorbitdehydrogenase	------	vermehrt	(20)
	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	vermehrt	------	(61)
	Aldolase	vermind.	------	(61)
	Alkoholdehydrogen.	vermind.	------	(61)
	Transaminase	unbeeinfl.	vermehrt	(31, 61)
	Glutaminsäuredehydr.	vermind.	------	(61)

Besonders erschwert wird die Bewertung dieser Symptome durch die Tatsache, daß die einzelnen Tierstämme, die beiden Geschlechter und sogar die verschiedenen Lebensalter uneinheitlich auf ein bestimmtes Agens mit ihrem Enzymhaushalt reagieren (64). Dazu kommt eine mögliche Reaktionsänderung des Organismus während eines bestimmten Krankheitsverlaufes in verschiedenen Stadien, bald im Sinne einer Erhöhung, bald im Sinne einer Senkung des Enzymspiegels (28). So erscheint es problematisch, die einzelnen Befunde zum Vergleich heranzuziehen. Es gibt jedoch Untersuchungen, die sich sehr gut mit den unseren in Beziehung setzen lassen. So ist von zahlreichen Autoren das Verhalten der Leberenzyme unter der Einwirkung von spezifischen Lebergiften bei der Maus und der Ratte einer genauen Beobachtung unterzogen worden (11;64). Unter dem Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff, Bleisalzen, Allylformiat, Thioacetamid, Phenylhydrazin, Alkohol und Chloroformnarkose reagieren fast alle Enzyme mit einer Verminderung. Einzig die Katalase verhält sich nach diesen Befunden unterschiedlich (64). Mit Hilfe der modernen bioptischen Methoden ist es jüngst gelungen, das Fermentspektrum im Verlaufe einer akuten Hepatitis und anderer Lebererkrankungen zu beobachten. Mit Ausnahme der stark aktivierten G-6-PD fand man eine weitgehende Enzyminsuffizienz des Lebergewebes (61). Untersuchungen, die eine mögliche Affinitätsänderung einzelner Fermente ihren Substraten gegenüber bei Leberschädigung ins Auge fassen, sind unseres Wissens nur bei der MDH im menschlichen Serum durchgeführt worden (31). Man fand die Michaelis-Konstante unbeeinflußt. Wir sind geneigt, den von uns beobachteten Affinitätsanstieg des CDE zum Acetyl-CoA als einen Kompensationsvorgang zu interpretieren, der durch intramolekulare Veränderung der Größe oder Struktur des Enzymmoleküls bedingt sein kann.

Von den Faktoren, die bei der Aufrechterhaltung oder Umstellung des Enzymhaushaltes eine Rolle spielen, wollen wir zur Beurteilung der Befunde unter Phalloidinvergiftung nur einige Möglichkeiten ins Auge fassen. Ganz allgemein betrachtet gibt es zwei Wege, die zu einer Veränderung der Fermentaktivität führen können; einmal die Variation der aktiven Proteinmenge auf dem Wege des Abbaues bzw. der Synthese oder der Elimination bzw. Aufnahme durch die Zelle (hierher gehören die Befunde von F. Bruns (11) mit der Annahme einer Enzymausschwemmung aus der geschädigten Leberzelle und die Versuche von W.H. Hauss und Mitarbeitern (28) mit der Annahme einer verminderten bzw. beschleunigten Synthese), zum anderen die Veränderung der katalytischen Aktivität

eines Enzyms bei gleichbleibendem Gehalt an funktionstüchtigem Protein, bedingt durch eine Hemmung bzw. Stimulation der Enzymmoleküle (hierher gehören alle Fälle von kompetetiver Hemmung oder Aktivierung durch irgendwelche Komplemente).

Gegen die Meinung, daß der Enzymschwund allein durch den Austritt von aktivem Protein aus der geschädigten oder zerstörten Zelle zu erklären sei, spricht in unserem Falle die weitgehende Konstanz der Zellplasmaenzyme (MDH, G-6-PD, ATP-HTP) bei ausgesprochener Verminderung des Mitochondrienenzymgehaltes.

Für einen direkten Angriffspunkt des Phalloidins an den verschiedenen Enzymen haben wir bei in vitro Versuchen keinen Anhaltspunkt finden können. Einzig und allein die Veränderung der Affinitätskonstante CDE zum Acetyl-CoA in vivo könnte ein Hinweis auf einen solchen Wirkungsmechanismus sein. W.H. Hauss hat neuerdings darauf hingewiesen (28), daß eine lokale pH-Verschiebung zu teils reversiblen teils irreversiblen Aktivitätsveränderung von Fermenten führen könnte. Wir konnten dieser Frage bei unseren Versuchen nicht weiter nachgehen. Da es sich bei unseren Befunden im Gegensatz zu den anderen um ausgesprochene Frühzeichen handelt, möchten wir sie als den direkten Ausdruck einer primären Leberzellschädigung durch das Phalloidin ansehen. Ob diese Enzymveränderungen nun mittelbare oder unmittelbare Folge der Giftwirkung sind und welcher Mechanismus im einzelnen zu den beobachteten Veränderungen im Enzymhaushalt führt, bleibt eine offene Frage.

Die Auswirkung dieser Schädigung liegt auf der Hand. Sie muß rasch zu einer Insuffizienz der Leber führen mit all ihren Folgen für den Stoffwechsel des Organismus.

Tabelle 3.) Einfluß der Phalloidinvergiftung auf die Bluteiweißkörper der weißen Maus. Dosierung: 4 γ pro g Maus s.c. Die Sera stammen von Sammelblut aus der Dekapitationswunde mehrerer Tiere eine Stunde nach Vergiftung. Die Werte entsprechen dem relativen Anteil der einzelnen Fraktionen am Gesamtprotein.

Zahl der Tiere	Albumine in rel. %		Globuline in rel. % Gesamtglobuline		ß-Globuline		Albumin-Globul. Quotient	
	Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere	Kontr. Tiere	verg. Tiere
3:3	57,5	43,0	42,5	56,5	19,7	30,3	1,35	0,77
8:8	59,5	37,0	38,5	62,4	19,0	44,0	1,54	0,59
3:3	49,0	40,0	50,4	60,0	23,4	22,6	0,97	0,66
	55,1	40,0	43,8	59,6	20,7	37,3	1,29	0,67
		- 28 %		+ 37 %		+ 56 %		- 48 %

Veränderung der Proteinverteilung im Blutserum von Mäusen unter dem Einfluß von Phalloidin

Die bemerkenswerten Veränderungen im Bereich der Fermentproteine bei der Phalloidineinwirkung legten den Gedanken nahe, nach ähnlichen Verschiebungen im Proteinspektrum des Blutserums zu fahnden, wozu die elektrophoretische Untersuchungsmethode am geeignetsten erschien.

Es wurde jeweils ein Sammelserum von einer Anzahl Tiere gewonnen und auf das Papier aufgetragen. Bei der Auswertung (s. die Abbildungen 10.) und 11.) und Tabelle 3.)) stößt man auf markante Abwandlungen des Serumproteinspektrums vergifteter Tiere: eine Abnahme der Albuminzacke um 28 %, eine Vergrößerung der Globulinzacke um 37 %, was vornehmlich durch die Vermehrung der β-Fraktion um 56 % bedingt ist, und dementsprechend eine Senkung des Albumin-Globulin-Quotienten um 48 %.

Abbildung 10.) Proteinspektrum des Serums normaler Mäuse.

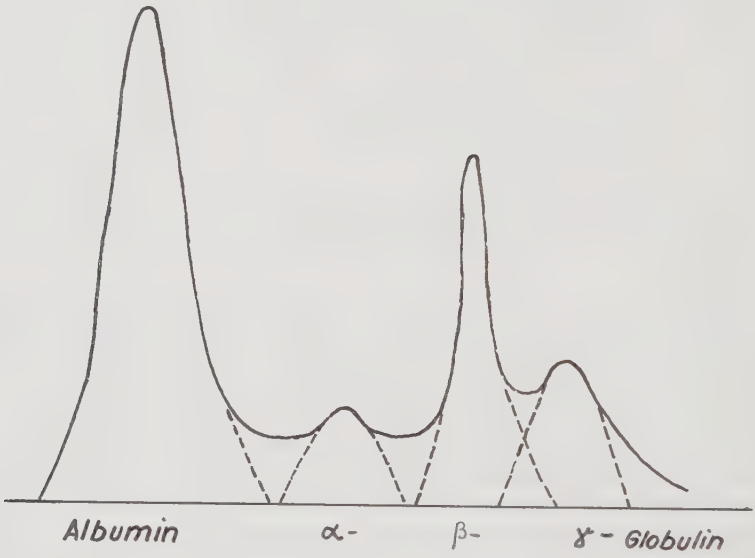
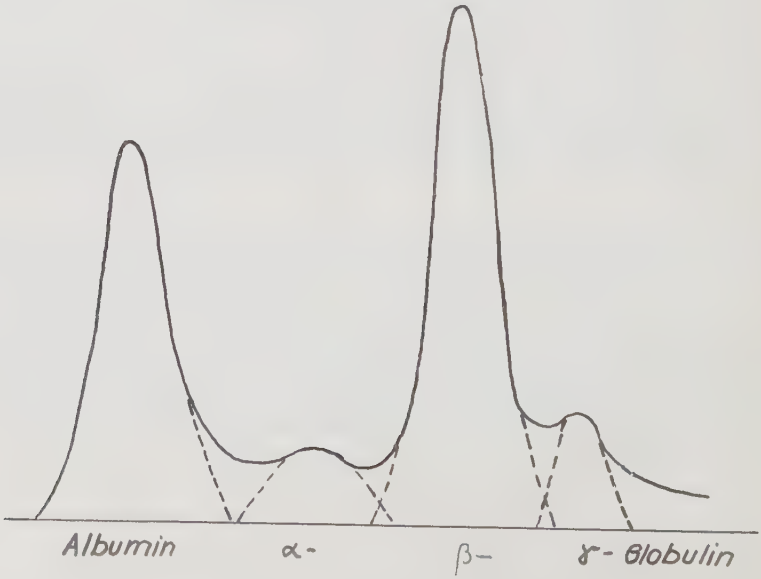


Abbildung 11.) Proteinspektrum des Serums phalloidinvergifteter Mäuse.



DISKUSSION

Bei der Vergiftung mit α-Amanitin, dem protrahiert wirkenden Anteil des Knollenblätterpilzes, fanden Th. Wieland und K. Dose (79) einen langsam einsetzenden Rückgang des Gesamtproteingehaltes im Serum von Maus und Ratte, der hauptsächlich durch den Abfall des Albumins auf die Hälfte der ursprünglichen Konzentration bedingt ist. Ähnliches konnten sie bei Fröschen und an der Kröte beobachten. Da es sich bei diesen Befunden um eine allmählich anlaufende, reversible Erscheinung handelt, nehmen die Autoren an, daß durch das Gift vor allem die Synthese der Albumine in der Leber unterbunden sei. Der rasch einsetzende Einfluß des Phalloidins auf die Serumproteine ist wohl anderer Genese. Wie im Zusammenhang mit den Durchströmungsversuchen in der isolierten Leber erörtert wird, erscheint die drastische Wirkung des Phalloidins auf einer Kapillarschädigung zu beruhen. Daß unter diesen Umständen gerade das niedermolekulare Albumin an das Interstitium verloren geht, erscheint verständlich. Die Zunahme der Globuline ist womöglich durch eine Proteinausschwemmung aus der schwergeschädigten Leberzelle zu erklären. Untersuchungen von H. Küchmeister und K.D. Voigt (39) und von N. Hannig und Mitarbeitern (29), die das Problem der Herkunft der Plasmaproteine zum Gegenstand haben, geben einen Anhaltspunkt für diese Erklärungsmöglichkeit. Diese Autoren kamen bei der elektrophoretischen Auftrennung der Leberproteine und Plasmaproteine bei experimentellen Leberschäden zu dem Ergebnis, daß die Veränderungen in den Eiweißspektren von Leber und Plasma ein gegensinniges Verhalten zeigen. Einem Abfall der β- und γ-Globuline in der Leber ging deren Anstieg im Plasma parallel, mit dem Albumin ging es gerade umgekehrt. Andererseits kann man einen Angriffspunkt im Sinne einer Störung der Proteinsynthese infolge der hohen Wechselzahl der Eiweißkörper nicht einfach außer Acht lassen. Eine endgültige Aussage über das Zustandekommen der Proteinveränderungen läßt sich also noch nicht machen.

Einfluß des Alloxandiabetes von Ratten auf die Phalloidinvergiftung

Wie aus den Untersuchungen von O. Wieland, M. Reiter und H. Fischer (77) hervorgeht, sterben Ratten und Mäuse nach Phalloidin-Amanitin-Vergiftung im hypoglykämischen Koma. Experimente französischer Autoren (12) zeigen nun, daß diabetische Tiere die Vergiftung nicht nur überleben, sondern sogar durch die Giftwirkung ihren Diabetes verlieren und sich völlig normalisieren. Wir versuchten im Verlaufe unserer Arbeiten diese aufsehenerregenden Befunde zu reproduzieren.

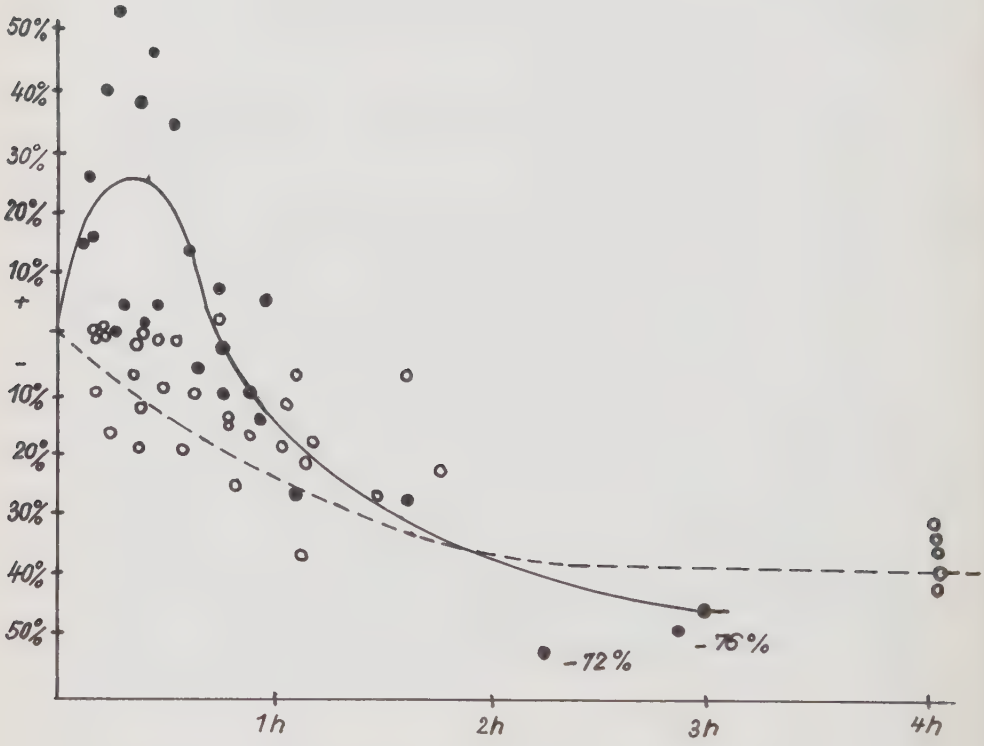
Nach orientierenden Versuchen zur Bestimmung der Grenzdosis für Phalloidin wurde als sicher letale Menge ein γ -Phalloidin pro g Ratte intraperitoneal injiziert, die bei den Kontrollen nach ungefähr 2,5 Stunden zum Tode führte. Wir beobachteten das Verhalten des Blutzuckers während des Vergiftungsverlaufs (Bestimmung in Abständen von ca. 10 Minuten aus dem Schwanzvenenblut) und führten Messungen des Lebergewichts, des Leberblutgehalts, des Leberglykogens und der Überlebensdauer durch. Da die Alloxantiere nach Phalloidin überlebten und ihren Diabetes von ca. 500 mg % behielten, keine Gewichtsabnahme zeigten, wiederholten wir die Vergiftung nach 7 Tagen und bestimmten nach 2,5 Stunden, der mittleren Überlebensdauer der Kontrollen, zum Vergleiche das Lebergewicht, den Leberblutgehalt und das Leberglykogen. Die Kontrollratten werden etwa eine S unde nach Verabfolgen des Giftes anämisch mit deutlicher Senkung der Körpertemperatur und liegen völlig kraftlos in ihrem Käfig, bis nach ca. 2,5 Stunden der Tod eintritt. Die Alloxantiere sind dagegen in ihrem sichtbaren Verhalten nur wenig beeinträchtigt und erholen sich vollständig.

Die graphische (Abbildung 12.)) und tabellarische (Tabelle 4.)) Darstellung der Versuchsergebnisse weist folgende Finzelheiten auf: im Blutzuckerprofil der Kontrollen zeigt sich im Verlauf der ersten 45 Minuten nach Vergiftung eine Erhöhung des Spiegels um 25 % des Ausgangswertes, in der Folgezeit ein starker Abfall der Werte bis auf 60 % des Ausgangswertes beim Tode. Bei den phalloidinvergifteten Diabetesratten ist kaum eine Zuckermobilisierung zu bemerken. Der Spiegel senkt sich nach Injektion des Giftes innerhalb von 4 Stunden fast kontinuierlich um etwa 40 % des Ausgangswertes, absolut gesehen um ca. 200 mg %, und hat nach 4 Tagen die alte Höhe wieder erreicht. Der Einfluß des Biabetes

auf die Knollenblätterpilzvergiftung wird auch deutlich bei den Ergebnissen der Bestimmung des Lebergewichts sowie des Blut- und Glykogengehaltes der Leber zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Injektion. Der Blutgehalt der diabetischen Leber ist mit 7,8 % im Durchschnitt als normal zu bezeichnen, bei den Kontrollen mit einem Gehalt von 44 % als exzessiv gesteigert. Das Leberglykogen sinkt im ersten Falle auf 1,55 % im Gegensatz zum völligen Verschwinden bei den Kontrollen.

Bei dem Versuch, die Ergebnisse an fünf weiteren diabetischen Ratten zu reproduzieren, ergaben sich folgende Abweichungen. Zunächst hatte sich im Gegensatz zu den ersten Versuchen bei allen Tieren ein magerer Diabetes ausgebildet. Die Ratten nahmen im Verlauf eines dreiwöchigen Diabetes mit einem Blutzuckergehalt von durchschnittlich 501,9 mg % um ein Fünftel des Ausgangswertes an Gewicht ab (von 256 auf 204 g im Durchschnitt). Bei Vorversuchen an fünf Tieren der gleichen Aufzucht stellte sich heraus, daß eine Giftdosis von 1 γ pro g Ratte erst nach 7 - 10 Stunden zum Tode führte. Um die Versuchszeit abzukürzen, setzten wir die Dosis auf 1,3 γ pro g Ratte herauf. Die Versuchsbedingungen unterschieden sich also im Vergleich zum ersten Male in der Form des experimentellen Diabetes und in der Dosis des Phalloidins. Die Kontrolltiere starben nach durchschnittlich 3 Stunden, die diabetischen nach durchschnittlich 6,25 Stunden; eine Alloxanratte überlebte allerdings ganz. Die Überlebenszeiten verhalten sich also wie 1:2. Hier kommt demnach nur noch ein verzögernder Effekt auf den Ablauf der Vergiftung zum Ausdruck, was man wohl auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen, vor allem auf den Charakter des Diabetes, zurückführen muß.

Abbildung 12.) Einfluß des Alloxandiabetes auf den Blutzuckergehalt von Ratten bei Phalloidinvergiftung.



Zur Abbildung 12.)Blutzuckersenkung und -steigerung sind prozentual zum Ausgangswert in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Phalloidindosierung 1 γ pro g Ratte. Die beiden Kurven stellen das Mittel aus 5 bzw. 4 Versuchen dar. s. Tabelle 4.)

•—•Normaltiere

o--odiabetische Tiere

Da wir aber nicht wissen, was in dem einen Falle zu der mageren, in dem anderen zu der fetten Form des Alloxandiabetes geführt hat, haben wir von weiteren Versuchen Abstand genommen. Die Ergebnisse des ersten Versuches sollen im folgenden kurz beleuchtet werden.

Tabelle 4.)

Diabetesdauer	Tiergewicht		Blutzuckergehalt		Leberglykogengehalt	
	diabet. Tiere	Kontr. Tiere	diabet. Tiere	Kontr. Tiere	diabet. Tiere	Kontr. Tiere
21 Tage	195 g	180 g	520(420)	110(150)	2,38 g%	0,04 g%
" "	165 g	180 g	560(395)	108(24)	2,44 g%	0,0 g%
" "	220 g	175 g	480(326)	94(24,8)	0,54 g%	0,0 g%
" "	240 g	180 g	470(332)	100(27)	0,02 g%	0,0 g%
" "	235 g	-	460(384)	--	2,36 g%	- -
	212 g	180 g	498(370)	104(96)	1,55 g%	0,012 g%

	Leberblutgehalt		Lebergewicht (g/kg Ratte)		Überlebensdauer	
	diabet. Tiere	Kontr. Tiere	diabet. Tiere	Kontr. Tiere	diabet. Tiere	Kontr. Tiere
	6,85 %	38 %	40,8 g	69,5 g	überlebt;	180 Min.
	5,25 %	29 %	40,0 g	57,0 g	"	165 "
	11,40 %	60 %	61,0 g	50,0 g	"	130 "
	7,50 %	44 %	50,0 g	41,0 g	"	135 "
	8,10 %	--	41,5 g	--	"	---
	7,80 %	42,5 %	46,5 g	54,5 g	überlebt;	132 Min.

Zur Tabelle 4.) Einfluß des Alloxandiabetes auf Blutzucker-, Leberglykogen-, Leberblutgehalt, Lebergewicht und Überlebensdauer der phalloidinvergifteten Ratte bei der minimalen letalen Dosis von 1 γ Phalloidin pro g Körpergewicht.

DISKUSSION

In Übereinstimmung mit den Befunden von J. Verne, P.F. Ceccaldi und S. Hebert (12) fanden wir eine günstige Beeinflussung der Phalloidinwirkung durch den experimentellen Alloxandiabetes bei der Ratte. Die Tiere überleben die minimale letale Dosis Phalloidin vollzählig, bei höherer Dosis überleben sie die Vergiftung zumindest länger. J. Verne und seine Mitarbeiter berichten aber, daß sich der Stoffwechsel seiner diabetischen Tiere nach Zufuhr von Knollenblätterpilzgift völlig normalisierte, vor allem, daß der Blutzucker zum Normalwert zurückkehrte. Im Gegensatz dazu hat der Blutzuckerspiegel unserer Alloxanratten nach einem vorübergehenden phalloidinbedingten Tiefstand nach etwa drei Tagen seine alte Höhe von durchschnittlich 500 mg % wieder erreicht. Als weiterer Ausdruck des größeren Resistenz des diabetischen Organismus gegenüber den Einwirkungen des Giftes ist auch das Ausbleiben des deletären Blutversackens in die Leber zu werten. Der teilweise Unterschied gegenüber den französischen Befunden geht womöglich auf die Verwendung des andersartigen Vollextraktes aus Knollenblätterpilzen zurück. Über den Mechanismus der antagonistischen Wirkung des Alloxandiabetes auf die Phalloidinvergiftung haben die einzelnen Untersucher die verschiedensten Vorstellungen.

So kamen J. Verne und Mitarbeiter (12) auf Grund ihrer Ergebnisse bei histologischen Untersuchungen des Inselorgans, bei denen sich nach Knollenblätterpilzvergiftung ein Schwund der Glukagon bildenden α-Zellen fand, zu der Überzeugung, die Alloxanwirkung finde ihre Erklärung dadurch, daß die Zerstörung der Insulin produzierenden β-Zellen den tödlichen Hyperinsulinismus, durch den das hypoglykämische Koma bedingt sei, unterbinde. Bei α-amanitinvergifteten Mäusen und Ratten konnte B. Stampfl (63) die Atrophie der α-Zellen allerdings nicht nachweisen. Für das Phalloidin wird diese Wirkungsweise unwahrscheinlich, weil sich der Diabetes unserer Alloxanratten, der von der Unversehrtheit der α-Zellen abhängig ist, nach einer kurz andauernden Milderung wieder voll einstellte.

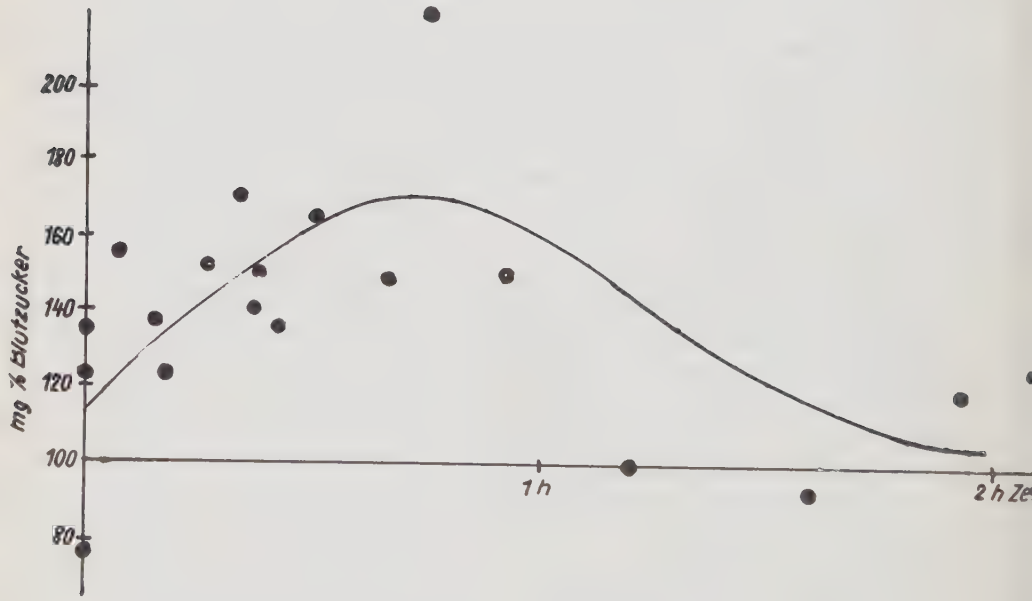
In einer neueren Arbeit wird von N. Cova (14) darauf hingewiesen, daß der Angriffspunkt des Knollenblätterpilzgiftes die insulinzerstörende Insulinase sei, denn das Gift bewirke in vivo eine eindeutige Senkung

Senkung der Insulinaseaktivität der Leber von Ratten. Nun weiß man (52), daß schon Hunger allein die Insulinaseaktivität der Leber stark beeinträchtigt. Es ist darum fraglich, ob dieses Ferment einen direkten Angriffspunkt des Amanitin darstellt, vielmehr kann man sich vorstellen, daß der Insulinaseabfall einen Analogiebefund zu den übrigen beobachteten Fermentinaktivierungen darstellt. Sehr instruktiv ist es, sich einmal die Größenordnung vor Augen zu halten, in der dieser Faktor in den Kohlenhydratstoffwechsel eingreifen soll. Z.B. (74) inaktiviert Hundeleber pro kg Körpergewicht in der Stunde etwa 1/25 bis 1/50 internationale Einheiten Insulin. Die Beeinflussung des KH-Stoffwechsels ist also zum Vergleich zu den anderen regulierenden Faktoren gering zu veranschlagen. Da die Veränderung im KH-Stoffwechsel unter der Phalloidinwirkung schlagartig und in großem Ausmaß einsetzt, ist dieser Angriffspunkt unwahrscheinlich und zur Erklärung der Alloxanwirkung auf die Phalloidinvergiftung unbefriedigend. Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen der Leberfermente phalloidinvergifteter Mäuse, die ein markantes Absinken des gesamten Fermenttiters zeigten, den Befunden von O. Wieland, D. Reinwein und F. Lynen (76), die eine deutliche Stimulierung der Enzyme des Fettsäurecyklus im Gefolge eines Alloxandiabetes bei der Ratte feststellen konnten, sowie den Ergebnissen von J.H. Copenhaver und Mitarbeitern (13), die eine Aktivierung des KH- und Eiweißstoffwechsels fanden, könnte man daran denken, daß der im Verlauf des Diabetes angekurbelte Enzymapparat eine größere Resistenz der Tiere gegenüber dem Gift ermöglicht, da der gewaltige Zuckerverschleiß während der Vergiftung durch die gesteigerte Produktion aus Eiweiß und Fett wettgemacht werden kann.

Glukoseproduktion und Farbstoffakkumulation durch die isolierte Meerschweinchenleber bei Phalloidinvergiftung

Nachdem sich nach hohen Phalloidindosen (3 γ pro g Tier) bei der Ratte in der ersten Phase der Vergiftung in der Mehrzahl der Fälle eine deutliche Blutzuckersteigerung zeigte (Abbildung 13.)), interessierte es uns, ob diese Zuckermobilisierung auch an der isolierten Leber zu erzielen sei. Gleichzeitig hofften wir, aus der Messung der Farbstoffaufnahmen aus der Durchströmungsflüssigkeit einen weiteren Hinweis auf die Permeabilitätsänderung der Leberkapillaren nach Phalloidininfusion zu bekommen.

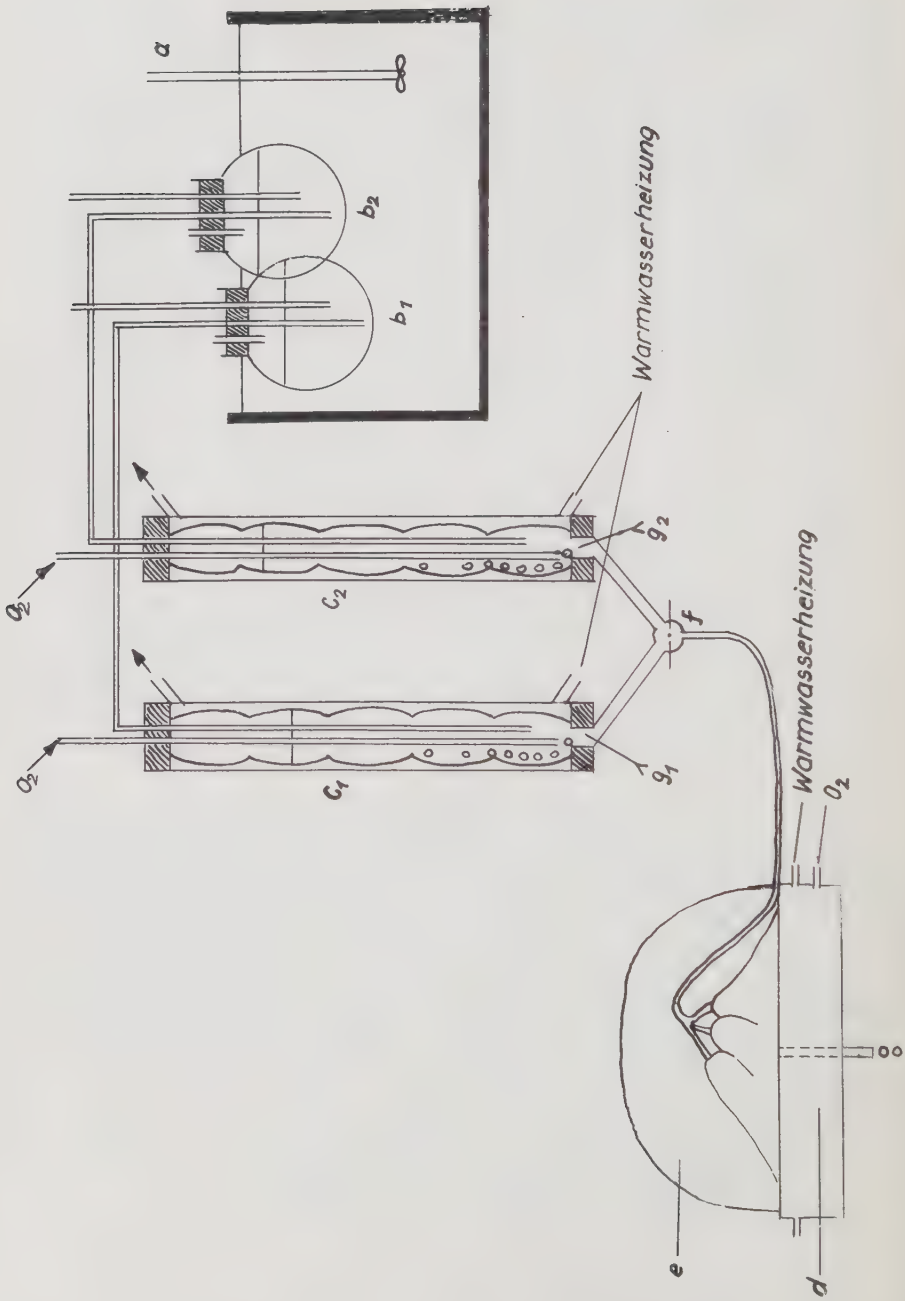
Abbildung 13.) Glukosemobilisierende Wirkung des Phalloidins.



Zur Abbildung 13.) Glukosemobilisierende Wirkung des Phalloidins bei Ratten. Dosierung: 3 γ pro g Ratte intraperitoneal. Die Kurve stellt das Mittel aus drei Versuchen dar.

Da die Durchströmung von Rattenlebern recht diffizil ist, wählten wir Meerschweinchen als Versuchstiere. Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von 1000 g wurden mit Urethan-Äther narkotisiert und die Lebern folgendermaßen exstirpiert (10): mit einem Scherenschnitt wurde der Bauchraum eröffnet und zunächst die vena cava caudalis für eine Heparininjektion aufgesucht. Die Heparinisierung des Tieres (3 mg in 0,5 ml physiol. Kochsalz) verhindert jegliche Trombenbildung und erleichtert so eine völlige Entblutung der Leber. Darauf bindet man den Oesophagus doppelt ab, durchtrennt ihn und fixiert das thorakale Ende am Rippenbogen, um seine Retraktion und eine damit verbundene Eröffnung des Brustraumes, die zu einem Kollaps der Lunge führen würde, zu vermeiden. Es folgt das Anlegen der Zuflußkanüle in die Pfortader. Wir verwendeten selbstangefertigte Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 1 mm für die Infusions- und einem Durchmesser von 3 mm für die Ausflußkanüle, um den Strömungswiderstand zu verringern. Die Pfortader wurde zuvor peripher abgebunden und proximal mit einer Schlaufe gedrosselt, die sich nach Eröffnen des Gefäßes und Einführen der Kanüle in das Lumen leicht zusammenziehen und zur Fixation benutzen ließ. Nach Unterbindung der vena cava caudalis dicht unterhalb der Leber eröffnet man den Thorax und legt die Ausflußkanüle vom rechten Vorhof aus eingehend in die vena hepatica und bindet sie dicht oberhalb des Zwerchfells in die Vene ein. Das Zwerchfell wird von der Brustwand abgelöst und mitsamt der Leber exstirpiert. Wir brauchten ungefähr 10 Minuten für die Isolierung des Organs.

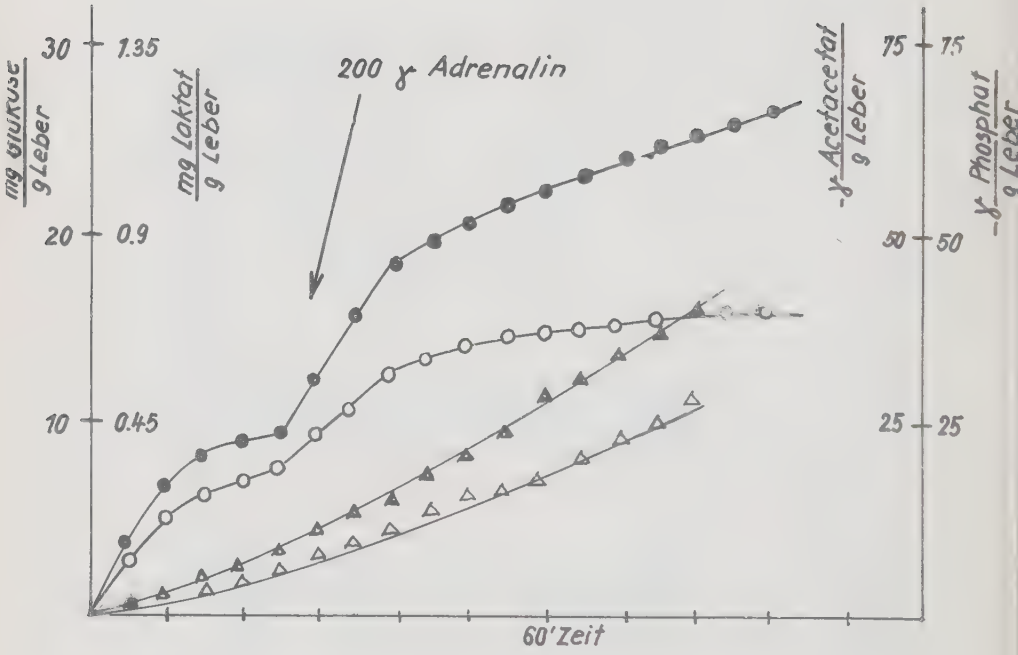
Die Leber wurde schnell in die vorgewärmte Durchströmungskammer gebracht und mit der Zwerchfellseite auf deren eingefetteten Boden gelegt, so daß die Ausflußkanüle unten aus der Durchbohrung des Bodens herausragte. Nach Anschluß an das Aggregat wurde die Durchflußgeschwindigkeit mit Hilfe eines Zweiwegehahns einreguliert. Die Durchströmung erfolgte unter konstantem Druck, konstanter Temperatur und unter O_2-Beatmung. Als Durchströmungsflüssigkeit diente einfache O_2- gesättigte Ringerlösung. Das Organ befindet sich in einer feuchten, isothermen Kammer mit Sauerstoffatmosphäre. Die Einzelheiten über die Vorrichtung sind aus der Skizze zu entnehmen.


a
b2
b1
Warmwasserheizung
g2
f
O2
c2
O2
c1
g1
Warmwasserheizung
O2
e
d

Versuchsanordnung zur Durchströmung von Ratten- und Meerschweinchenlebern. Ein Thermostat (a) sorgt für gleichbleibende Temperatur der Durchströmungsflüssigkeit in den Mariotteschen Flaschen (b_1 und b_2), die als Reservoir und Druckregler dienen, und hält die Isothermie in den beiden Rückflußkühlern (c_1 und c_2) aufrecht, die wir zur rückläufigen Durchperlung der Ringerlösung mit Dauerstoff verwendeten. Gleichzeitig wird der Boden der Durchströmungskammer (d) konstant geheizt, und der Sauerstoff, der in die feuchte Kammer geblasen wird, vorgewärmt. Die Leber befindet sich während des Versuchs unter einer dicht abschließenden Glasglocke (e). Mit Hilfe des Zweiwegehahnes (f), der mit den beiden Mariotteschen Flaschen in Verbindung steht, kann man leicht die Durchströmungsflüssigkeit wechseln. Zwei Injektionskanülen (g_1 und g_2) kurz vor dem Zweiwegehahn angebracht, dienen zum Einspritzen der entsprechenden Testsubstanzen (Adrenalin, Hyaluronidase, Histamin etc.). Nach dieser Anordnung ist es möglich, ein Organ bei konstanter Temperatur (hier 37 Grad C), unter konstantem Druck (hier 25 cm Wassersäule), mit konstanter Durchflußgeschwindigkeit (hier 15 bis 17 ml pro Minute) und unter Wechseln der Lösung zu durchströmen. Die austretende Durchströmungsflüssigkeit wird bei Zimmertemperatur fraktioniert aufgefangen.

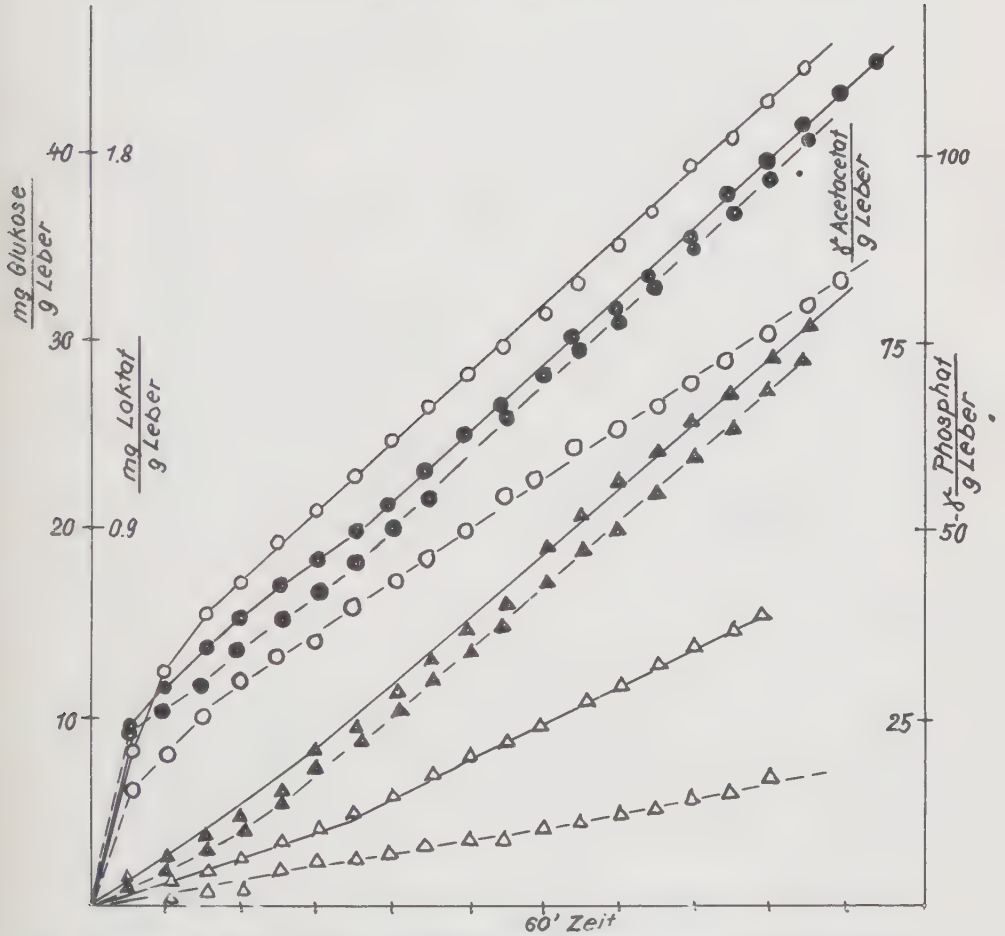
Die Leber wurde etwa 1,5 Stunden in der Durchströmungskammer gehalten, die durchgeflossene Ringerlösung minütlich abgemessen, um eine Kontrolle der Durchlaufgeschwindigkeit zu haben, und in 5-Minuten-Portionen gesammelt. Anschließend wurde auf eine eosinhaltige Ringerlösung umgeschaltet, um die Farbstoffelimination zu untersuchen. Der saure Farbstoff Eosin eignet sich weit besser als das basische Evans-blue, das infolge der Ladungsverhältnisse von den Gewebsproteinen ohnehin schon in großem Ausmaß angereichert wird. (5). Die einzelnen Fraktionen wurden dann auf ihren Gehalt an Glukose, Milchsäure, Acetessigsäure und Phosphorsäure untersucht (Näheres hierzu s. methodischer Teil). Die Produktion der verschiedenen Stoffwechselprodukte, umgerechnet auf 1 g durchströmte Leber, ist in den Abbildungen in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Da mitunter erhebliche Bezirke der Leber undurchströmt bleiben, erhebt sich die Frage nach der geeigneten Bezugsgröße. Wir machten uns die Anfärbung des durchspülten Gewebes mit Eosin zunutze und legten das Gewicht der farbstoffmarkierten Anteile bei der Auswertung der Ergebnisse zugrunde.

Abbildung 14.)



Zur Abbildung 14.) Die Wirkung von Adrenalin auf die Glukose-, Milchsäure-, Acetessigsäure- und Phosphatproduktion der durchströmten Meerschweinchenleber. ●—● Glukose; ○—○ Milchsäure; ▲—▲ Phosphat; △—△ Acetessigsäure; in der Abbildung ist die jeweils produzierte Menge in Abhängigkeit von Lebergewicht und Zeit aufgetragen.

Abbildung 15.) Beobachtung verschiedener Stoffwechselprodukte in der durchströmten Leber unter Einfluß von Phalloidin.



Zu Abbildung 15.) Glukose-, Milchsäure-, Acetessigsäure- und Phosphatproduktion der durchströmten Meerschweinchenleber unter dem Einfluß von Phalloidin. ——— Kontrollversuch; ----- bei Vergiftung; ●——● Glukose; ○——○ Milchsäure; ▲——▲ Phosphat; △——△ Acetessigsäure; Dosis: 20 γ pro ml Ringerlösung. In der Abbildung ist die jeweils produzierte Menge in Abhängigkeit von Lebergewicht und Zeit aufgetragen. Die gestrichelten Kurven stellen das Ergebnis bei Vergiftung, die ausgezogenen das des Kontrollversuchs dar.

Zunächst erschien es uns notwendig, in einem Modellversuch zu prüfen, ob die Leber in unserer Versuchsanordnung auf sicher glykogenmobilisierende Substanzen (Adrenalin) (66;7) deutlich anspricht. Mit einer Adrenalininjektion von 200 γ Adrenalin 25 Minuten nach Beginn der Durchströmung erzielten wir eine signifikante Glukoseausschüttung. Die Milchsäure stieg bei diesem Versuch ebenfalls deutlich an. s. Abbildung 14.)

Die analogen Experimente mit Phalloidin wurden derart durchgeführt, daß die Leber während des gesamten Versuchs mit gifthaltiger Ringerlösung, enthaltend 20 γ Phalloidin pro ml, durchströmt wurde.

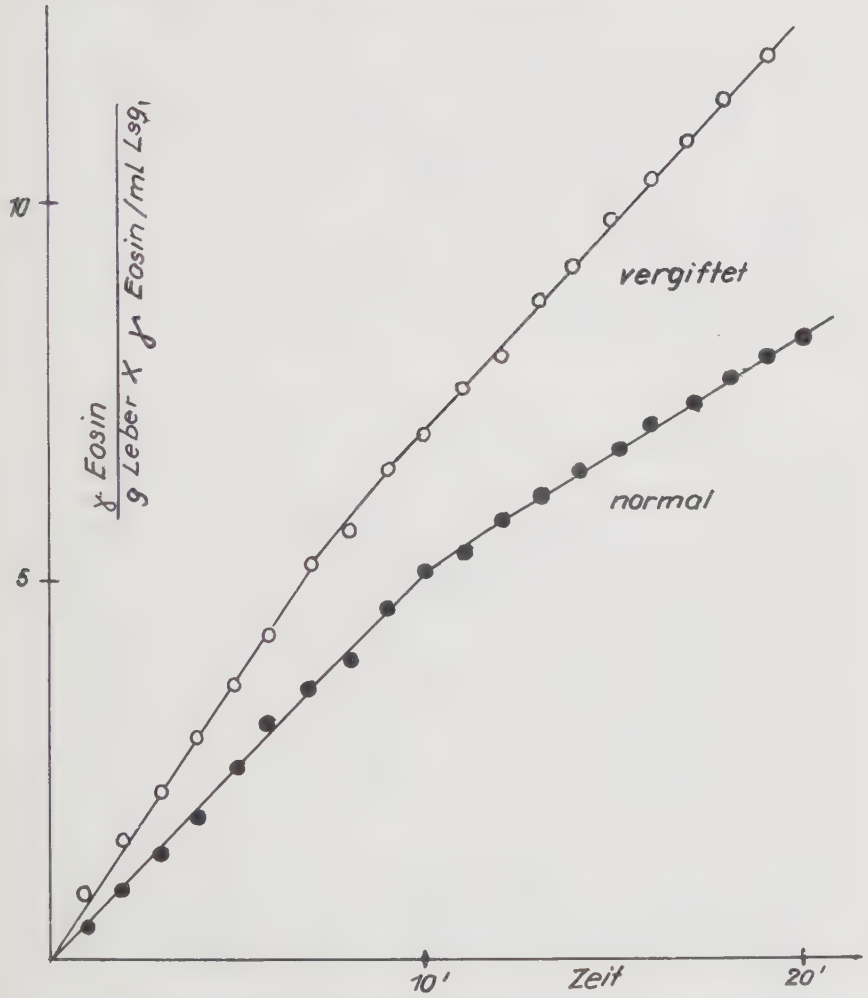
In zwei Fällen ergab die Messung der Farbstoffelimination durch die vergiftete Leber nach 90 Minuten Phalloidindurchströmung im Vergleich zu den Kontrollen, die ebenfalls nach 90 Minuten Vorperiode daraufhin untersucht wurden, eine Steigerung der Eosinaufnahme um 56 % von 7,9 γ Eosin pro g Leber auf 12,4 γ Eosin pro g Leber, beides bezogen auf einen Eosingehalt von 1 γ pro ml Durchströmungsflüssigkeit, wie die Abbildung 16.) zeigt. Die Ergebnisse der Durchströmungsversuche sind vorläufig und müssen in weiteren Versuchen verifiziert und erweitert werden.

DISKUSSION

Im Gegensatz zu der signifikanten Blutzuckersteigerung von nahezu 100 % im Anfangsstadium der Vergiftung bei der Ratte konnten wir bei den beschriebenen Durchströmungsversuchen an der isolierten Meerschweinchenleber keinen zuckermobilisierenden Effekt erzielen. Es ist schwer zu beurteilen, welche Faktoren dieses andersartige Verhalten der isolierten Leber hervorrufen.

Das Fehlen einer glykogenabbauenden Wirkung könnte zunächst darauf beruhen, daß die Leber in unserer Anordnung nur auf sehr spezifisch und äußerst stark phosphorylaseaktivierende Stoffe wie Adrenalin anspricht, (66;7), so daß die Phalloidinwirkung unterschwellig bleibt. Weiter besteht die Möglichkeit, daß ein unbekanntes endogenes Prinzip im Zusammenhang mit dem Phalloidin zu der Zuckersteigerung führt, die demnach bei dem isolierten Organ nicht in Erscheinung tritt. Endlich muß man erwägen, ob das Gift überhaupt unter den Bedingungen des Durchströmungsversuches an die Stelle seiner Wirkung gelangt. Womöglich spielen endogene

Abbildung 16.) Eosinelimination in der durchströmten Leber.



Zur Abbildung 16.) Darstellung der Eosinaufnahme in Abhängigkeit von Lebergewicht, Zeit und Eosingehalt der Durchströmungsflüssigkeit. Der Eosingehalt der Durchströmungsflüssigkeit schwankte von Versuch zu Versuch um etwa 1 γ pro ml.

Permeabilitätsfaktoren eine Rolle, worauf auch die in vitro Versuche von B. Hess (30) hinweisen, der nur bei digitoninbehandelten Mitochondrien eine die Atmungskettenphosphorylierung entkoppelnde Wirkung des Phalloidins beobachten konnte. Wir können vorläufig nur feststellen, daß eine mit gifthaltiger Ringerlösung durchströmte Leber keine erhöhte Zuckerausscheidung aufweist. Ähnlich verhält es sich mit den übrigen untersuchten Stoffwechselprodukten wie Milchsäure und Phosphat. Wir konnten infolge der Kostbarkeit des kristallisierten Phalloidins nur wenige Durchströmungsversuche durchführen, bei denen wir ein unterschiedliches Verhalten vor allem der Acetessigsäure gemessen haben. Die Acetessigsäure stieg in einem Falle von Phalloidinvergiftung im Sinne einer Exponentialfunktion zu sehr hohen Werten an. Wir konnten diesen Befund im zweiten Versuch allerdings nicht reproduzieren.

Zur Beurteilung einer möglichen Permeabilitätsänderung der Leberkapillaren ist es angebracht, sich noch einmal die Leberveränderungen bei Phalloidinvergiftung zu vergegenwärtigen. Die anfängliche Zunahme des Lebergewichts ist offenbar dadurch bedingt, daß ein starker Flüssigkeitseinstrom ohne allzu deutliche Blutanschoppung einsetzt, wie der Einfluß des Alloxandiabetes auf die Vergiftung deutlich macht, bei dem man zwar eine starke Gewichtszunahme, aber keine Blutvermehrung feststellen kann. (vergl. Tabelle 4.!). Es folgt die Blutanschoppung auf ca. 50 Gewichtsprozent in der Rattenleber in Abhängigkeit von der Dosierung. In den Lebern überlebender Tiere zeigen sich ausgedehnte hämorrhagische Infarkte. Diese Befunde führten zu der Untersuchung der Eosinakkumulation in der durchströmten Leber unter dem Einfluß von Phalloidin. Das unter Gifteinwirkung stehende Parenchym nimmt 56 % Eosin mehr auf. Diese Mehraufnahme kann bedingt sein durch eine Ansäuerung des Gewebes, wie A. Bethe (5) gezeigt hat, und zweitens durch Änderung der Wanddurchlässigkeit der Kapillaren. Nach den in vivo Befunden möchten wir letzteres für wahrscheinlicher halten und die verstärkte Farbstoffauswanderung als einen deutlichen Hinweis auf eine Kapillarschädigung werten.

Es liegt nahe, in diesem Zusammenhang die Frage nach der Todesursache bei Phalloidinvergiftung zu stellen. Bisher sah man den Grund allein in einem hypoglykämischen Koma (77). Das klinische Bild: Tachypnoe, Erblassen und Temperaturabfall; die Erhöhung des Hämatokritwertes, der deutliche Abfall der Serumalbumine, die nahezu trockene Dekapitations-

wunde und am eindrucksvollsten das Blutversacken in die Leber und das Splanchnikusgebiet sprechen aber dafür, daß der relativ frühe Tod nach etwa einer Stunde bei höherer Dosierung durch ein akutes Kreislaufversagen eintritt. Für das Phalloidin scheint demnach im Gegensatz zu den übrigen Knollenblätterpilzgiften ein spezifischer Angriffspunkt an den Kapillarwandstrukturen eigentümlich zu sein. Es ist möglich, daß die Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung auf der Cytochromstufe, wie sie von B. Hess (30) mit einer Phalloidinkonzentration von 0,1 m Mol pro Liter an Leberzellmitochondrien erzielt wurde, zur Einstellung der Energielieferung führt, die gerade für die Aufrechterhaltung der Kapillarwandstruktur notwendig ist. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit besteht darin, daß eine primäre Leberzellschädigung zur Freisetzung gefäßaktiver Substanzen vom Charakter des Histamins führt und die beschriebenen Erscheinungen hervorruft.

ZUSAMMENFASSUNG

Das kristallisierte Knollenblätterpilzgift Phalloidin zeigt in Abweichung von dem langsam angreifenden α-Amanitin in einer Dosis von 1 γ pro g Ratte bzw. 4 γ pro g Maus eine rasch einsetzende Wirkung mit folgenden Symptomen: schon nach einer Stunde tritt bei der Maus, nach zwei Stunden bei der Ratte der Tod ein als Folge eines akuten Kreislaufversagens, das mit einer ausgeprägten Hypoglykämie einhergeht. Als Ursache des Kreislaufversagens wird eine hochgradige Gefäßwandschädigung durch das Gift angenommen, die zu einer Bluteindickung, Verschiebung des Serumproteinspektrums und Blutversacken vor allem in die Bauchorgane und hier besonders in die Leber führt.

Untersuchungen des Leberenzymhaushaltes der Maus eine Stunde nach Injektion der DL 100 ergeben eine weitgehende Beeinträchtigung folgender Enzyme: im Falle der G-6-PD, der ATP-HTP, des CDE, der GOT, der β-HAD und der β-KTH findet eine Inaktivierung statt. Die MDH bleibt weitgehend unbeeinflußt. Als Ausdruck einer Affinitätssteigerung des CDE zum Acetyl-CoA ist die Michaelis-Konstante um etwa die Hälfte herabgesetzt. In vitro läßt sich keines der genannten Enzyme mit Phalloidin beeinflussen. Eine Erklärung dieser Erscheinungen ist vorläufig nicht möglich.

Durch papierelektrophoretische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß diesem Fermentschwund in der Leber charakteristische Veränderungen des Serumproteinspektrums parallel gehen. Das Albumin ist etwa auf 2/3 der Ausgangskonzentration reduziert, das β-Globulin um die Hälfte des Normalwertes vermehrt. Als Ursache für den Albuminrückgang wird der Verlust an das Interstitium infolge eines Kapillarschadens, für den Globulinzuwachs ein Proteinaustritt aus den geschädigten Leberzellen diskutiert.

Die Wirkungen des Phalloidins lassen sich durch den experimentellen Alloxandiabetes zum Teil unterdrücken. Dieser Antagonismus könnte darauf beruhen, daß die während des Diabetes beobachtete Ankurbelung des Enzymapparates der Leber zu einer Erhöhung der Widerstandskraft der Zelle gegen das Stoffwechselgift führt. Eine endgültige Erklärung des Schutzeffektes ist aber nach den bisherigen Untersuchungen nicht möglich.

Eine phalloidinbedingte initiale Zuckermobilisierung, die in vivo zu einer nahezu 100 %-igen Blutzuckersteigerung führt, läßt sich an der isolierten Leber, die auf Phosphorylaseaktivierung durch Adrenalin deutlich anspricht, nicht erzielen. Demnach ist die Zuckerausschüttung keine direkte Folge der Phalloidinwirkung. In der phalloidindurchströmten Leber ist eine Steigerung der Eosinakkumulation zu messen. Im Zusammenhang mit dem Vergiftungsbild wird dieser Befund als Zeichen einer Kapillarwandschädigung gewertet.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) Athenstädt, R. — Diplomarbeit, München (1956)

(2) Awzara, J. — J. Biol. Chem., 200, 537 (1953)

(3) Bargoni, N. — Experientia (Basel), 7, 104, (1951)

(4) Barker, S.B. und Summerson, W.H. — J. Biol. Chem. 138, 535, (1941)

(5) Bethe, A. — Allgemeine Physiologie, Springer (1952)

(6) Biuretmethode: — Klinisch chemische Untersuchungsmethoden zum Phtometer Eppendorf (E-1/1-3)

(7) Bodo, R. u. Marks, H.P. — J. Physiol., 65, 48 (1928)

(8) Boehringer, C.F. — Biochemische Untersuchungsmethoden (MDH-Test im menschlichen Serum)

(9) Boehringer, C.F. — Biochemische Untersuchungsmethoden (SGOT-Test im menschlichen Blutserum)

(10) Brauer, C., Pesotti, A. u. Pizzolato, L. — Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 78, 174 (1951)

(11) Bruns, F. u. Neuhaus, J. — Biochem. U., 326, 4 (1955)

(12) Ceccaldi, P.F., Verne, J. u. Hebert, S. — C.R. Soc. Biol. 144, 645 (1950)

(13) Copenhaver, J.H., Shipley, I.G. u. Meyer, R.K. — Arch. Biochem., 34, 360 (1951)

(14) Cova, N. — II Farmaco, 12, 5 (1957)

(15) D'Ans, J. u. Lax, E. — Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Springer (1949)

(16) Elly, J.O. u. Ross, M.N. Nature (London), 168, 323 (1951)

(17) Fiske, C.H. u. Subarow, Y. J.Biol.Chem., 66, 375 (1925)

(18) Garbade, K.H. Klinisch chemische Untersuchungsmethoden zum Photometer Eppendorf (B_3-/1-3)

(19) Garbade, K.H. Klinisch chemische Untersuchungsmethoden zum Photometer Eppendorf (P-2/1-4)

(20) Gerlach, U. Kli. Wo., 1144 (1957)

(21) Glaser, L. u. Brown, D.H. J. Biol. Chem., 216, 67 (1957)

(22) Gomori, G. Methods of Enzymology, ed. Collowik, S.P., u. Kaplan, N.O., Band I, S. 139. New York: Academic Press (1955)

(23) Grassmann, W. u. Hannig, K. Zeitschr. physiol. Chem., 290, 1 (1952)

(24) Grunert, R.R. u. Phillips, F.H. Arch. Biochem., 30, 217 (1951)

(25) Gyermek, L. u. Fekete, G. Nature (London), 174, 386 (1955)

(26) Hagedorn, H.C. u. Jensen, B.N. Biochem. Z. 137, 46 (1923)

(27) Hauss, W.H. u. Leppelmann, H.J. Kli. Wo., 65, 71 (1957)

(28) Hauss, W.H., Leppelmann, H.J. u. Planitz, H. Kli.Wo., 957 (1957)

(29) Hennig, N., Demling, C. u. Kinzelmeier, H. Kli.Wo., 435 (1953)

(30) Hess, B. Biochem. U., 328, 325 (1956)

(31) Hess, B. u. Gehm, K.E. Kli.W., 91, (1955)

(32) Hoffmann-Ostenhoff, O. Enzymologie, Springer (1954)

(33) Holzer, H. (Persönl. Mitteilung)

(34) Holzer, H., Sedlmeyer, J. u. Kiese, M. Biochem. Z., 328, 176 (1956)

(35) Kochakikian, D., Bartleft, M.N. u. Moc, J. Americ. J. Physiol., 154, 489 (1948)

(36) Kornberg, A. u. Horecker, B.L. Methods of Enzymology, ed. Collowick, S.P., u. Kaplan, N.O., Bd. I., S. 323. New York: Academic Press (1955)

(37) Kubowitz, F. u. Ott, P. Biochem. Z.; 141, 94 (1943)

(38) Kuhn, R. u.Quadbeck, G. Chem. Ber. 84, 844 (1951)

(39) Küchmeister, H. u. Voigt, K.D. Verh.dtsch.Ges. In.Med. 59, 492, (1953)

(40) La Due, B.S., Wroblewski, F. u. Karmen, A. Science, 120, 497 (1957)

(41) Lang, K. Kli.Wo., 875 (1947)

(42) Lineweaver, H. u. Burk, D. J. Amer.Chem. Soc., 56, 658, (1934)

(43) Litwak, G., Williams (jr), J.N., Feigelson, P. u. Elvehjem, C.H. J. Biol. Chem., 187, 605 (1951)

(44) Litwak, G., Williams, J.N., Chen, L. u. Elvehjem, C.A. J. Nutr., 47, 299 (1952)

(45) Lowry, O.H., Farr, A.L. u. Randall, R.J. J. Biol. Chem., 193, 265, (1951)

(46) Lynen, F. u. Ochoa, S. Biochem. Biophys. Acta, 12, 299 (1953)

(47) Lynen, F. u. Wieland, O. Methods of Enzymology, ed. Collowik, P.S. u. Kaplan, N.O., Bd. I, S. 567, New York: Academic Press (1955)

(48) Meyerhof, L. Biochem. Z., 133, 176, (1927)

(49) Meyerhof, L. Pflügers Arch. ges. Physiol., 175, 20 (1919)

(50) Miller, C.C. J. Biol. Chem., 172, 113 (1948)

(51) Milliman, N. Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 77, 700 (1951)

(52) Mirsky, I.A., Broh-Kahn, R.H., Perisutti, G. u. Brand, J. Arch. Biochem., 20, 10 (1949)

(53) Ochoa, S. Methods of Enzymology, ed. Collowik, P.S. u. Kaplan, N.O., Bd. I, S. 685. New York, Academic Press (1955)

(54) Potter, V.R. u. Klug, L. Arch. Biochem., 12, 241, (1947)

(55) Potter, V.R. Methods of Enzymology, ed. Collowik, P.S. u. Kaplan, N.O., Bd. I, S. 10. New York: Academic Press (1955)

(56) Reiter, M. Biochem. Z., 328, 408 (1957)

(57) Reiter, M. u. Noe, J. Biochem. Z., 328, 454 (1957)

(58) Rosenthal, O., Rogers, C.S. u. Wars, M.M. J. Biol. Chem. 185, 699 (1950)

(59) Schmidt, C.G. Kli. Wo., 457 (1956)

(60) Schmidt, C.G., Schlief, H. u. Hillenbrand, H.J. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 74, 646 (1955)

(61) Schmidt, E., Schmidt, F.W. u. Wildhirt, E. Kli. Wo., 842 (1957)

(62) Shemin, D. u. Simon, E.J. Americ. Chem. Soc., 75, 1520 (1953)

(63) Stampfl, B., zitiert nach Wieland, O., Reiter, M. u. Fischer, H. Arch. exptl. Path. u. Pharmak., 215, 75 (1952)

(64) Sprinz, H. u. Waldschmidt-Leitz, E. Z. physiol. Chem. 293, 16 (1953)

(65) Stern, J.R. u. Ochoa, S. J. Biol. Chem., 179, 491 (1949)

(66) Sutherland, E.W. u. Cori, C.I. J. Biol. Chem., 188, 531 (1951)

(67) Tabor, H., Mehler, A.H. u. Stadtmann, E.R. J. Biol. Chem. 204, 127 (1953)

(68) Tsuboi, K.H. u. Stowell, R.E. Cancer Res., 11, 221 (1951)

(69) Vogt, M. Arch. exptl. Path. u. Pharm., 190, 406 (1938)

(70) Waino, W.W., Eichel, B., Eichel, H.J., Person, P., Esten, F.L. u. Allison, J.B. J. Nutr., 49, 465 (1953)

(71) Walker, O. Biochem. J., 58, 699 (1955)

(72) Warburg, O. Wasserstoffübertragende Fermente, Verl. Dr. W. Saenger, Berlin (1948)

(73) Warburg, O. u. Christian, W. Biochem. U., 238, 131 (1931)

(74) Weissberg, H.F., Friedmann, A. u. Levine, R. Americ. J. Physiol., 158, 332 (1949)

(75) Westerfeld, W.W. u. Richert, D.A. J. Biol. Chem., 192, 35 (1951)

(76) Wieland, O., Reinwein, D. u. Lynen, F. Biochemical Problems of Lipids, ed. Popjak, G. u. Le Breton, E., Butterworths Scientific Publications, London (1955), S. 155

(77) Wieland, O., Fischer H. u. Reiter, M. Arch. exptl. Path. Pharmakol., 215, 75 (1952)

(78) Wieland, O. Biochem. Z., 329, 568 (1958)

(79) Wieland, Th. u. Dose, K. Biochem. Z., 325, 439 (1954)

(80) Williams, J.N. u. Elvehjem, C.A. J. Biol. Chem., 181, 559 (1949)

(81) Zöllner, N. u. Groebl, H. Z. physiol. Chem. 290, 177 (1952)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. O. Wieland danken, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, über das Problem der Phalloidinvergiftung zu arbeiten, und dafür, daß er während der ganzen Arbeit mit seinem Wissen und seiner Erfahrung mir zur Seite gestanden hat. Groß ist meine Dankbarkeit der Studienstiftung des Deutschen Volkes gegenüber, deren großzügige Unterstützung mir erst ein sorgloses Studieren und Experimentieren erlaubte und deren Geist mir zum dauernden Ansporn wurde. Danken möchte ich auch allen anderen, die sonst zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

LEBENSLAUF

Am 17. 7. 1931	in Breslau geboren als Sohn des damaligen Gutsinspektors Max Matschinsky und seiner Ehefrau Maria, geb. Flögel.
April 1937 bis August 1941	Besuch der Volksschule in Roth-brünnig, Krs. Goldberg in Schlesien.
August 1941 bis Dezember 1944	Besuch der Herzog-Heinrich-Schule zu Liegnitz in Schlesien.
Am 9. 2. 1945	Flucht aus Rothbrünnig. Der Treck erreicht Ende März Kleinpriesen im Kreise Komotau im Sudetengau.
März bis Juli 1945	Aufenthalt in Kleinpriesen im Kreis Komotau.
Am 8. 8. 1945	Rückkehr nach Rothbrünnig.
Am 23. 7. 1946	Ausweisung aus Schlesien.
Vom 26. 8. 1946 bis 15. 8. 1955	wohnhaft in Westönnen, Krs. Soest in Westfalen.
Vom 1. 9. 1946 bis 15. 3. 1953	Besuch des Mariengymnasiums zu Werl / Westfalen.
Am 5. 5. 1953	Beginn des Medizinstudiums in Freiburg/Brsg. an der Albert-Ludwig-Universität.
Im April 1954	Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes.
Am 3. 8. 1955	ärztliche Vorprüfung in Freiburg.
Am 5. 11. 1955	Beginn des klinischen Studiums in München an der Ludwig-Maximilians-Universität.
Am 9. 12. 1958	ärztliche Prüfung in München.